

CARINA DE LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA ASSOCIADA AO
TREINAMENTO DE SALTO SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA
E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM RATOS PORTADORES DE TUMOR
DE WALKER 256**

Identificação de mediadores participantes neste processo

Dissertação de Mestrado defendida
como pré-requisito para a obtenção do
título de Mestre em Educação Física,
no Departamento de Educação Física,
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

CARINA DE LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA ASSOCIADA AO
TREINAMENTO DE SALTO SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E
PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER 256**

Identificação de mediadores participantes neste processo

**CURITIBA
2008**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Luiz Cláudio, pelo exemplo de docente, pela grande oportunidade de fazer este trabalho, orientação e por tudo que aprendi durante esses dois anos.

Aos meus pais (Beto e Vera) por me ensinarem que o mais importante nesta vida é o estudo e por me apoiarem sempre que eu precisei, não tenho palavras para definir o quanto vocês são importantes para mim. Vocês são os melhores pais do mundo, AMO MUITO VOCÊS! As minhas manas queridas Lela e Gabi pelo carinho e amizade. Agradeço a Deus todos os dias pela família maravilhosa que tenho.

Ao meu amado André por sempre me apoiar, me cuidar e me agüentar e por estar sempre ao meu lado durante todo esse tempo que estamos juntos. Obrigada pelo carinho, amor e compreensão, TE AMO MUITO! A família do André (Regina, Luiz, Igor e Paulinha) pelo apoio e pelo incentivo. Obrigada Regina pelas palavras de conforto e positivas, pelo carinho e amizade. Vocês são maravilhosos!

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Celular:

Luciana pelo companheirismo durante esses dois anos de personal training de ratos, de horas no laboratório fazendo os protocolos, pelas risadas, pelas conversas e pela grande amizade. Obrigada pela união que deu muito certo, você é uma grande amiga!

Andressa e Fabíola pelas boreguices e risadas que demos juntas, é muito bom trabalhar com vcs! Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e companhia freqüente, faça chuva ou faça sol, no laboratório.

Diogo, Katya e Rica pelas dicas de western blotting, ao Everson, Carine e Luiz Alexandre por sempre estarem dispostos em tirar minhas dúvidas e me ensinarem vários protocolos, ao Fernando pelas ajudas no citômetro, a Naiara pela

ajuda nos treinamentos e pela boa vontade sempre, a Ana, Dani Pequito, Cris Pessini, Sandro, Paulo, Marcelo, Jaisson pelas constantes ajudas nos longos experimentos e aos demais colegas Isa, Ju, Gleisson, Dalton pela colaboração e amizade.

Ao Luizão (biotério) por facilitar as coisas e estar sempre disponível em nos ajudar.

Aos professores Dr. Raul Osieck e Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt por aceitar prontamente o pedido de colaborar com o presente trabalho.

Obrigada a todos por fazerem parte dessa fase tão importante da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	3
1.2 Caquexia	4
1.3 Alteração do metabolismo energético.....	6
1.4 Alteração do metabolismo do tecido adiposo	7
1.5 Alteração do metabolismo do tecido muscular	8
1.6 Fator indutor de proteólise	10
1.7 Apoptose celular, câncer e proteínas envolvidas	11
1.8 Metabolismo da glutamina	13
1.9 Metabolismo da glutamina e sua relação com processos neoplásicos.....	16
1.10 Glutamina e sistema imunitário	18
1.11 Atividade física e sistema imunitário.....	19
1.12 Atividade física e câncer.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Delineamento experimental.....	27
4.2 Amostra.....	27
4.3 Protocolo de treinamento	27
4.4 Suplementação com glutamina.....	28
4.5 Determinação do peso corpóreo e dos tumores	28
4.6 Procedimento de ortotanásia	29
4.7 Parâmetros Bioquímicos	29
4.7.1 Mensuração plasmática da glutamina	29

4.7.2 Mensuração plasmática da glicemia.....	29
4.7.3 Mensuração plasmática dos triacilgliceróis.....	30
4.7.4 Mensuração plasmática do lactato	30
4.8 Determinação do glicogênio hepático.....	31
4.9 Metodologias para ensaios envolvendo células do tumor de Walker .	32
4.9.1 Implantação do tumor	32
4.9.2 Cultivo das células tumorais.....	32
4.9.3 Produção de lipoperóxidos	33
4.9.4 Quantificação protéica para dosagem de lipoperóxido.....	34
4.9.5 Apoptose e necrose de células do tumor de Walker 256 por citometria de fluxo.....	34
4.9.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	35
4.9.6.1 Quantificação protéica das amostras para eletroforese-western blotting	35
4.9.6.2 Separação eletroforética das proteínas	36
4.9.6.3 Western Blotting.....	36
4.10 Metodologia dos ensaios utilizando linfócitos	37
4.10.1 Obtenção de linfócitos.....	37
4.10.2 Capacidade proliferativa dos linfócitos.....	37
4.11 Análise estatística	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Parâmetros de Caquexia.....	39
5.1.1 Triacilglicerolemia.....	39
5.1.2 Concentração plasmática de glutamina	40
5.1.3 Glicogênio hepático	41
5.1.4 Lactatemia.....	42
5.1.5 Glicemia	43
5.2 Peso do baço	45
5.3 Parâmetros relacionados ao tumor de Walker 256.....	46
5.3.1 Peso do tumor	46
5.3.2 Peso corpóreo após implantação do tumor.....	47

5.3.3 Proliferação de células tumorais “ <i>ex vivo</i> ”	48
5.3.4 Produção de lipoperóxidos	49
5.3.5 Western Blotting de proteínas do tumor de Walker 256	50
5.3.5.1 PIF	50
5.3.5.2 Bax	51
5.3.5.3 Bcl-2	52
5.3.6 Apoptose das células do tumor de Walker 256	53
5.4 Parâmetro imunitário	55
5.4.1 Proliferação de linfócito T	55
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	-	Análise de Variância
Apaf-1	-	Fator de indução de proteases apoptóticas -1
APP	-	Proteína de fase aguda
ATP	-	Adenosina trifosfato
BCAA	-	Aminoácido de cadeia ramificada
BSA	-	Albumina bovina sérica
Con A	-	Concanavalina A
CRH	-	Hormônio liberador de corticotropina
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DO	-	Densidade ótica
EPM	-	Erro padrão da media
EX	-	Grupo exercitado
EXG	-	Grupo exercitado suplementado com glutamina
EXW	-	Grupo exercitado portador do tumor de Walker 256
EXWG	-	Grupo exercitado portador do tumor de Walker suplementado com glutamina.
FITC	-	Fluorocromo fluoresceína
GABA	-	Ácido butírico amino γ
HMB	-	B-hidroxi B-metilbutirato
HRP	-	Horseradish peroxidase
IKK	-	Quinase da proteína IKB
IKB	-	Proteína inibitória do NF-KB
IgA	-	Imunoglobulina A
IGF -1	-	Fator de crescimento parecido com a insulina
IGFBP-1	-	Proteína ligante ao IGF-1
IL-1	-	Interleucina um
IL-3	-	Interleucina três
IL-4	-	Interleucina quatro
IL-6	-	Interleucina seis
IL-10	-	Interleucina dez

LDh	- Lactato desidrogenase
IKB	- Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear kB
IKK	- Quinase da proteína IKB
LMF	- Fator de mobilização lipídica
LPL	- Lípase lipoprotéica
INF	- Interferon γ
NAD ⁺	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-forma reduzida.
NBT	- Nitroblue Tetrazolium.
NF-kB	- Fator de transscrição nuclear kappa B
NK	- Células natural killer
PBS	- Tampão Fosfato-salina
PIF	- Fator indutor de proteólise
PKC	- Proteína quinase C
PMA	- Éster de Forbol Miristato Acetato.
Rpm	- Rotação por minuto
S	- Grupo sedentário
SDS-page	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.
SG	- Grupo sedentário suplementado com glutamina
SOD	- Superóxido dismutase
SW	- Grupo sedentário portador do tumor de Walker 256
SWG	- Grupo sedentário portador do tumor de Walker 256 suplementado com glutamina
TAGs	- Triacilglicerois
TCA	- Ácido tricloroacético
TEA	- Trietanolamina
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPP	- Trifenilfosfina
UCP	- Proteínas desacopladoras
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa
VO _{2max}	- Consumo máximo de oxigênio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

TABELA 1 - Comparação da anorexia em indivíduos com câncer caquexia versus inanição	04
TABELA 2 - Resumo dos dados de parâmetro de caquexia	44
TABELA 3 - Peso dos indivíduos antes e 15 dias após inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso no mesmo período	47

FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do Ciclo de Cori.....	07
FIGURA 2 - Sistema proteolítico Ubiquitina-proteossoma ATP dependente	09
FIGURA 3 - Ativação do NF-KB no músculo esquelético pelo PIF	11
FIGURA 4 - Mecanismos da apoptose celular	12
FIGURA 5 - Síntese e degradação da glutamina e as enzimas atuantes	14
FIGURA 6 - Representação esquemática do fluxo de glutamina entre órgãos no estado alimentado e em condições normais	15
FIGURA 7 - Reações que envolvem o glutamato	16
FIGURA 8 - Representação esquemática do fluxo de glutamina entre órgãos no processo neoplásico. A espessura das setas indica o grau comparativo de utilização do aminoácido	17
FIGURA 9 - Relação da intensidade do exercício e susceptibilidade a infecções virais	20
FIGURA 10 - Liberação de citocinas em situação de sepse e de exercício.	21
FIGURA 11 - Concentração de triacilglicerol sérico (mg/dL)	39
FIGURA 12 - Concentração de glutamina plasmática (mmol/L)	40
FIGURA 13 - Concentração hepática de glicogênio (μmol/g de tecido)	41
FIGURA 14 - Lactatemia (mmol/L)	42
FIGURA 15 - Glicemia (mg/dL)	43
FIGURA 16 - Peso do baço (gramas)	44
FIGURA 17 - Peso do tumor (g)	46
FIGURA 18 - Proliferação de célula tumoral (cpm)	48
FIGURA 19 - Produção de lipoperóxidos (nmol/mg proteína)	49
FIGURA 20 - Expressão de PIF no tecido tumoral	50
FIGURA 21 - Expressão de Bax no tecido tumoral	51
FIGURA 22 - Expressão de Bcl-2 no tecido tumoral	52
FIGURA 23 - Percentual de células em apoptose, necrose, viáveis e com dupla marcação de tecido tumoral	53
FIGURA 24 - Apoptose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256	54
FIGURA 25 - Necrose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256	54
FIGURA 26 - Proliferação de linfócitos T	47
FIGURA 27 - Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose e por necrose	64

RESUMO

Câncer é uma doença que leva ao desenvolvimento da síndrome da caquexia. Esta síndrome está relacionada a alterações no metabolismo de carboidrato, lipídeo e proteína que envolve disfunções no eixo neuroimunendócrino que leva a progressiva perda de peso e depleção das reservas corporais. Vários estudos têm mostrado que a prática regular de atividade física está relacionada com a prevenção de câncer e é importante coadjuvante durante o seu tratamento. A glutamina, aminoácido considerado condicionalmente essencial, possui um papel importante em pacientes com câncer que encontra-se em grande estado catabólico por melhorar o balanço nitrogenado e atividade de células imunitárias. O objetivo desse estudo foi investigar a associação do exercício físico com a suplementação de glutamina sobre a proliferação tumoral, parâmetros de caquexia e proliferação de linfócitos em ratos portadores do tumor de Walker 256. Ratos wistar foram divididos em oito grupos: Sedentário (S), sedentário suplementado com glutamina (SG), exercitado (E), exercitado suplementado com glutamina (EG), sedentário portador de tumor (SW), sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), exercitado portador de tumor (EW) e exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). O treinamento consistiu de 10 séries de saltos (com sobrecarga relativa a 50% do peso corporal acoplada ao tronco) com duração de 30 segundos cada e intervalo de um minuto entre as séries, por dia, quatro vezes por semana, durante oito semanas. Após a sexta semana de treinamento, foi injetado 2×10^7 de suspensão de células do tumor de Walker 256 (1mL) no flanco direito dos animais nos grupos com tumor e iniciou-se a suplementação com glutamina (125mg/Kg/dia). A ortotanásia foi realizada 15 dias após a inoculação, seguida pela coleta de sangue, tecidos e células. Relacionado aos parâmetros de caquexia, os grupos SW e SWG apresentaram hiperlactatemia ($3,24 \pm 0,4$; $3,18 \pm 0,3$ respectivamente) e hipertriacilglicerolemia ($187,5 \pm 27,4$; $203 \pm 23,3$ respectivamente) mais elevado quando comparado a EW ($99,18 \pm 12,8$) e EWG ($103,5 \pm 16,6$) e o grupo SW apresentou diminuição mais acentuada da concentração de glicogênio hepático comparado aos demais grupos. A suplementação com glutamina foi capaz de manter a concentração plasmática de glutamina nos grupos SWG e EWG comparada a seus respectivos controles. Em adição, foi observada redução significativa do crescimento tumoral nos grupos EW ($16,45 \pm 1,6$ g) e EWG ($14,52 \pm 1,5$ g) comparado a SW ($25,07 \pm 2$ g) e SWG ($22,68 \pm 1,7$ g) acompanhada da diminuição da proliferação de células tumorais “*ex vivo*”, aumento da peroxidação lipídica, diminuição da expressão das proteínas Bcl-2 e PIF, aumento da expressão da proteína Bax e consequentemente aumento da morte ocasionada por apoptose. A suplementação com glutamina e o exercício físico tiveram efeito direto sobre a proliferação de linfócitos estimulados com conA, apresentando efeito somatório. Estes resultados sugerem que o exercício de salto melhora alguns parâmetros relacionados a síndrome da caquexia e reduz a massa tumoral através de mecanismos relacionados a diminuição da proliferação de células tumorais através da diminuição da expressão de Bcl-2, e do aumento da apoptose, através do aumento da expressão de Bax, da peroxidação lipídica e da capacidade proliferativa de linfócitos. A associação do exercício com a suplementação com glutamina foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa de linfócitos.

Palavras chave: Exercício, glutamina, câncer, apoptose, sistema imunitário

ABSTRACT

Câncer is a disease that leads cachexia syndrome. This syndrome is characterized by changes in the carbohydrate, fat and protein metabolism and involves neuroimmunoendocrine mechanism, leading to progressive body weight loss and lean body mass depletion. Many studies have shown that regular exercise has a protective and therapeutic aid in the treatment of some disease such as cancer. Glutamine, classified as a conditionally essential amino acid, has been postulated to be an important immuno-modulation amino acid and improves nitrogen balance in cancer patients. The main goal of this study is to investigate the effect of the association between physical activity and glutamine supplementation about tumor proliferation, cachexia parameters and lymphocytes proliferation in Walker 256 tumor-bearing rats. The animals were divided into 8 groups: Sedentary (S), sedentary supplemented (SG), exercised (E), exercised supplemented (EG), sedentary tumor-bearing (SW), sedentary tumor-bearing supplemented (SWG), exercised tumor-bearing (EW) and exercised tumor-bearing supplemented (EWG). Training section consisted of 10 bouts, 30 second each, with 50% body weight load attached to the back followed by 1 minute of resting, 4 times a week during 8 weeks. A suspension of Walker 256 tumor cells (1mL of 2×10^7 cells/mL) was inject in the rats (tumor-bearing) after 6 weeks of training and started the supplementation with glutamine (125mg/Kg/day). All individuals were killed 15 days post tumor inoculation and the blood, tissue and cells were harvested. Related with cachexia parameters, the SW and SWG groups showed hyperlacticidemia ($3,24 \pm 0,4$; $3,18 \pm 0,3$ respectively) and hypertriglycerolemia ($187,5 \pm 27,4$; $203 \pm 23,3$ respectively) stronger than EW ($99,18 \pm 12,8$) and EWG ($103,5 \pm 16,6$) and the SW group showed reduced hepatic glycogen content compared to others groups. Glutamine supplementation was able to keep the glutamine plasmatic concentration when compared to controls groups. Also, there was expressive reduction of the tumor growth in the EW ($16,45 \pm 1,6$ g) and EWG ($14,52 \pm 1,5$ g) groups when compared to SW ($25,07 \pm 2$ g) and SWG ($22,68 \pm 1,7$ g) groups, of tumor cells proliferation "ex vivo", of Bcl-2 and PIF expression and increase of the lipid peroxidation, Bax expression. Glutamine supplementation and exercise showed enhance lymphocytes proliferation. Our data suggest that physical exercise reduced tumor growth accompanied by reduction anti-apoptotic protein and increase pro-apoptotic protein and cachexia parameters. Exercise associated to glutamine supplementation enhanced lymphocytes proliferation.

Keywords: exercise, glutamine, cancer, apoptosis, immune systems

1. INTRODUÇÃO

O câncer contribui para 7,1 milhões de mortes no mundo, podendo ser considerado a segunda maior causa de morte nos países ocidentais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). O número de casos de câncer diagnosticados tem aumentado significativamente no mundo inteiro (LABOUREY,2007). No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontavam 472.050 casos novos de câncer sendo os tipos mais prevalentes, à exceção de pele não melanoma, de próstata e pulmão no sexo masculino, mama e colo de útero no sexo feminino, acompanhada pelo mesmo perfil da magnitude observada pelo mundo (INCA,2005).

O termo câncer é usado para designar o crescimento celular anormal, formando uma massa denominada tumor, com capacidade ilimitada de crescimento (PASTERNAK, 2002). Tumores malignos são caracterizados por apresentarem taxa metabólica alta, maior aumento no consumo de glicose e glutamina, sendo estes considerados substratos importantes para o crescimento das células cancerosas (MEDINA et. al., 1992). Quanto maior a malignidade do tumor, maior é a taxa de glutaminólise. Estudos relatam que a glutamina é fonte principal de carbono para células tumorais, independente da quantidade de glicose disponível (PARRY-BILLINGS, et. al., 1990).

Em condições fisiológicas normais, a concentração de glutamina é constante, sua homeostase depende do equilíbrio da sua produção e utilização (GRIFFITHS,2001). Em condições onde há grande estresse metabólico e estado de catabolismo intenso, exemplo o câncer, pode haver tanto diminuição na concentração de glutamina plasmática como também nos tecidos, podendo levar a algumas alterações fisiológicas adaptativas para o aumento da síntese desse aminoácido (KRZYWKOWSKI, et. al., 2001; ALPERS,2006). Uma dessas adaptações é a intensa mobilização de proteína pelos pulmões e principalmente pelos tecidos musculares, desencadeando um processo de caquexia e dificultando o processo de recuperação do paciente. Embora as adaptações sejam importantes para manter o funcionamento das células imunitárias, parecem ser insuficientes para manter a concentração plasmática de glutamina (KRZYWKOWSKI et.

al.,2001). Com a utilização excessiva de glutamina pelas células tumorais e imunitárias, há competição para a possível utilização desse aminoácido, reduzindo-o no plasma, levando a uma deficiência na funcionalidade do sistema imunitário. Partindo desta hipótese, a suplementação de glutamina poderia diminuir o efeito do catabolismo, aumentando a atividade das células imunitárias.

O aparecimento do câncer pode estar relacionado com o estilo de vida. A prática de atividade física regular é elemento significativo na prevenção e controle dessa doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer estima que 25% das causas de câncer no mundo são consequência do estilo de vida sedentário, sobrepeso e obesidade. Fatores estes que contribuem para aumento do estrogênio e testosterona, hiperinsulinemia e depressão do sistema imunitário (CAMPBELL e MCTIERNAM, 2007). A atividade física influencia as alterações dos hormônios esteróides e insulina e a modulação imunitária, provoca alterações na produção de radicais livres, mudanças na composição corporal e na massa óssea, com efeito direto sobre o tumor (WESTERLIND et. al., 2003).

Estudo em ratos com tumores, demonstrou que o exercício físico atenua a perda de massa muscular induzida pelo câncer, aumentando a sobrevivência (BACURAU et al., 2000). Ainda, Em animais submetidos a treinamento físico, os efeitos observados incluem inibição da tumorigênese, resistência à implantação do tumor, diminuição da taxa de crescimento tumoral e do aparecimento de metástases (LEE, 2003).

Tudo indica que o sedentarismo aumenta a probabilidade do desenvolvimento de câncer, ainda, a redução da atividade física acompanhada pelas mudanças metabólicas ocasionadas pelo câncer pode acelerar o processo de perda de massa muscular acompanhado de fraqueza (OLDERVOLL, et.al., 2004). Pessoas que praticam atividade física possuem maior resistência no processo de recuperação de tumor maligno. O uso da glutamina durante o tratamento da doença pode minimizar os efeitos catabólicos, auxiliando na recuperação. Assim, praticantes de atividade física que fazem uso de glutamina durante o tratamento podem apresentar maiores probabilidades de sucesso no combate a doença.

1.1 Câncer

Câncer é uma doença causada por alterações do DNA, ou seja, alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular, com aumento desordenado e incontrolado do número de células. É produto de várias mutações somáticas acumuladas numa única célula que leva ao descontrole no ciclo celular, como falhas nos processos que induzem a divisão celular e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada, denominada apoptose (PASTERNAK, 2002). Essas mutações afetam duas grandes classes de genes que são: genes de proliferação, conhecidos como proto-oncogenes, os quais codificam proteínas que auxiliam na divisão celular e genes anti-oncogenes, considerados supressores tumorais (ALBERTS et al., 2002).

Em geral, as células tumorais podem assumir características diferentes. Existem tumores considerados benignos que são bem diferenciados, conservam mais as funções celulares, possuem crescimento lento, crescem de forma compacta e permanecem no local de origem, sem metastizar e os tumores malignos, que variam de bem diferenciados a anaplásicos, possuem ritmo de crescimento rápido e descontrolado, invadem e destroem os tecidos circundantes, entrando na corrente sanguínea e vasos linfáticos (COTRAN et al, 2000). Todos os tumores dependem de suporte estrutural, nutricional, vascular e em alguns casos, humoral, que são supridos pelo próprio organismo, de modo a se comportarem como parasitas depletando as reservas do hospedeiro (CURI, 2000). Geralmente, alguns tumores competem com o hospedeiro por nutrientes, provocando algumas alterações metabólicas como astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia. Essas alterações, associadas ao desenvolvimento do tumor podem induzir a debilidade do organismo e levar o hospedeiro a desenvolver o quadro denominado síndrome da caquexia. Essa síndrome aparece em cerca de 20 a 70% dos pacientes com câncer dependentemente do tipo do tumor (TISDALE, 2004).

1.2 Caquexia

Síndrome da caquexia é caracterizada por anorexia, perda de peso involuntária, perda de tecido muscular e adiposo (ARGILÉS et. al., 2005), fadiga, anemia, sarcopenia, saciedade precoce, edema (ROSS; FEARON, 2002), prejuízos na função imunitária (ARDIES, 2002), levando a competição entre o tumor e o hospedeiro, promovendo severos distúrbios metabólicos, inclusive hipermetabolismo (ARGILES et. al., 2005). Os sintomas se acentuam com o progresso da doença, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes com tumor maligno avançado (ROSS; FEARON, 2002).

A caquexia ocorre devido a inabilidade funcional para ingestão ou utilização de nutrientes, que pode estar associada a um mecanismo de interferência no trato gastrointestinal como obstrução ou má absorção, intervenção cirúrgica ou devido ao tratamento (INUI, 2002). Com isso ocorre diminuição da ingestão alimentar, denominada anorexia, com conseqüente perda de peso. As mudanças metabólicas ocasionadas pela anorexia durante a síndrome da caquexia diferem do quadro de inanição. Diferenças como metabolismo basal, perda de massa muscular são alguns fatores que diferenciam os dois estados (INUI, 2002) (TABELA 1).

Variável	Inanição	Câncer
Ingestão alimentar	↓	↓ (→*)
Gasto energético basal	↓	↑
Gordura corporal	↓	↓
Músculo esquelético	→	↓

TABELA 1 - Comparação da anorexia em indivíduos com câncer caquexia versus inanição

*Parece que a diminuição da ingestão alimentar é proporcional a perda de peso corporal do indivíduo.

Existem muitos mediadores envolvidos na indução da anorexia em pacientes com câncer; entre eles destaca-se a ação das citocinas que pode auxiliar

diretamente na indução de anorexia, através da sua modulação sobre motilidade e esvaziamento do sistema gastrointestinal ou indiretamente via sistema neural, alterando sinais eferentes que afetam a saciedade (ARGILÉS, et.al., 2005). Citocinas como IL-6, IL-1 e TNF, estão envolvidas no desenvolvimento desse tipo de anorexia, possivelmente pela sua interação com os centros controladores da fome no hipotálamo, estimulando a liberação de substâncias supressoras do apetite, como aumento da concentração do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e diminuição de hormônios estimuladores como neuropeptídeo-Y (ARGILÉS et.al., 2005, DUNLOP; CAMPBELL, 2000)

A diminuição da massa muscular e gordura corporal, que ocorre nesses pacientes, pode ser diretamente causada por fatores liberados pelo tumor ou indiretamente devido à resposta do hospedeiro (TISDALE, 2004). O intenso quadro catabólico que se instala no indivíduo portador de tumor, debilitando-o e reduzindo suas perspectivas de recuperação, pode também ser consequência das alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, que ocorrem devido ao aumento da demanda energética gerada pela presença do tumor (TISDALE, 2004). Isto é observado, pois ocorre ativação do mecanismo hepático compensatório (gliconeogênese) para manutenção plasmática de substratos energéticos ao hospedeiro, os quais são captados pelo tecido tumoral. Participa também no desenvolvimento deste quadro a hipoinsulinemia, o aumento da concentração de citocinas e dos hormônios contrarreguladores como cortisol, glucagon e catecolaminas (ARGILÉS et al, 1997; FERNANDES et al. 1991).

A melhor maneira de tratar a caquexia é através da cura do câncer, o que é mais difícil em casos onde o tumor encontra-se em estágio avançado. A opção terapêutica é aumentar a ingestão nutricional com utilização de alguns nutrientes específicos e diminuir a perda de massa muscular e gordura corporal. A ingestão de aminoácidos pode teoricamente poupar a proteína tanto do metabolismo muscular como da gliconeogênese (ARGILES et. al., 2001).

1.3 Alteração de metabolismo energético

O gasto energético basal varia muito de acordo com o local onde o tumor encontra-se instalado (GORDON et.al., 2005). Não se sabe exatamente como tumores influenciam o gasto energético basal, porém estudos sugerem que pode ser através do aumento da regulação das proteínas desacopladoras (UCP 1, 2 e 3), uma família de proteínas da membrana mitocondrial, que aumenta a termogênese e o gasto energético (GORDON et.al., 2005). Bing, et.al. (2000) verificaram que ratos portadores de adenocarcinoma MAC16, tumor que induz a severa perda de peso, tinham aumento da expressão de UCP1 no tecido adiposo marrom e da expressão de UCP 2 e 3 no músculo esquelético, aumento de ácidos graxos livres, consequentemente diminuição de tecido adiposo.

A maioria dos tumores sólidos depende quase que exclusivamente do metabolismo anaeróbico da glicose como sua principal fonte energética, gerando lactato. Em condições catabólicas pode ocorrer a conversão de lactato em glicose pelo fígado por gliconeogênese, processo conhecido como ciclo de Cori (DUNLOP; CAMPBELL 2000; BARBER et. al., 1999; TISDALE, 2000). Em pacientes com câncer a atividade do ciclo de Cori está aumentada o que contribui para o aumento do gasto energético (INUI, 2002). A conversão de glicose para lactato nas células tumorais produz dois ATPs, enquanto a conversão de lactato para glicose no fígado requer seis ATPs (FIGURA 1). Esse aumento na demanda de glicose esta relacionado com diminuição do glicogênio no fígado, que ocorre devido ao aumento de AMP cíclico hepático (HIRAI, et.al.; 1997).

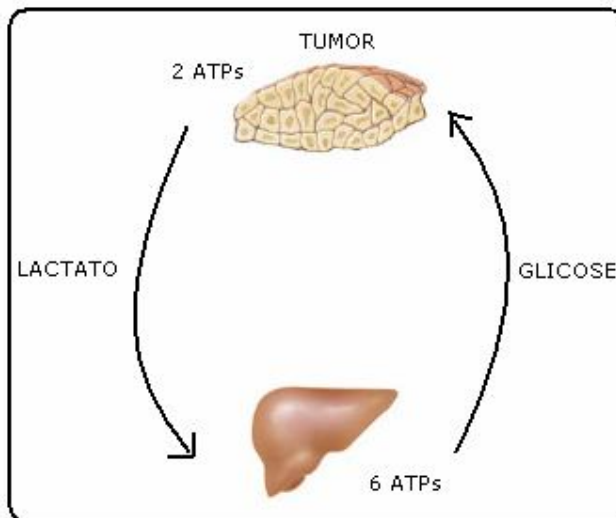


FIGURA 1 – Representação esquemática do Ciclo de Cori . A glicose é convertida em lactato, onde requer a utilização de 6 ATPs, enquanto que a conversão de glicose para lactato nas células tumorais produz 2 ATPs.

1.4 Alteração do metabolismo do tecido adiposo

No metabolismo de lipídeos ocorre aumento de sua mobilização, decréscimo da lipogênese e diminuição da atividade da lipase lipoprotéica, enzima responsável pela quebra dos triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos, para que estes possam ser captados pelos tecidos, levando a hiperlipidemia (BARBER et. al., 1999; TISALE, 2000), aumento da secreção hepática de VLDL e da síntese de ácidos graxos (TISDALE, 2004). Em adição, ocorre inibição da captação de glicose para o tecido e a capacidade de sintetizar ácido graxo “de novo” devido a menor atividade da enzima chave do processo, acetil-CoA carboxilase (ARGILÉS et al, 2005). Algumas dessas mudanças podem ser mediadas por citocinas pró-inflamatória, como TNF, INF- γ e IL-1 a qual pode inibir a lipoproteína lípase que exerce papel central na lipogênese do tecido adiposo (GORDON, et.al., 2005).

Fatores derivados de tumores também estariam envolvidos em alterações do tecido adiposo. Esse componente é conhecido como fator mobilizador de lipídeos (LMF) que é uma glicoproteína de 43kDa que foi primeiramente isolada em urina de pacientes com caquexia; esta proteína interage com o receptor β 3-adrenérgico

promovendo aumento do AMP cíclico, levando a ativação da Lipase Hormônio-sensível (ARGILÉS, et.al.,2001). Este fator induz diretamente a lipólise, não somente *in vivo*, mas em preparações isoladas de músculo, produzindo perda de tecido adiposo acompanhado de aumento da expressão de ubiquitina, uma das vias responsáveis pela proteólise (TISDALE, 2005). Ainda, segundo HIRAI et.al. (1997), o aumento da expressão de LMF em ratos portadores de adenocarcinoma MAC16 pode estar correlacionado com diminuição do glicogênio hepático.

1.5 Alteração do metabolismo do tecido muscular

A perda de proteína corporal é um dos principais sintomas da caquexia e está envolvida não somente com a perda de músculo esquelético como também da musculatura cardíaca, resultando em alterações das funções cardiovascular (BUSQUETS, et.al., 2007). Tanto a redução da síntese protéica como o aumento da degradação, são observados em biópsia muscular de pacientes caquéticos (BARACOS, 2000). Busquets et.al. (2007) observaram que indivíduos com câncer e em estado caquético apresentavam aumento da apoptose de células do músculo esquelético, acompanhado pelo aumento de TNF- e IL-6 e diminuição da glicose plasmática.

Além do aumento do catabolismo protéico que ocorre em pacientes caquéticos, observa-se aumento da síntese de proteínas de fase aguda (APP) pelo fígado, isto limita a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica no músculo esquelético juntamente com decréscimo na concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), fundamental para manutenção da massa muscular corporal (TISDALE, et.al.; 2002).

Com relação a proteólise muscular que ocorre em indivíduos caquéticos, existem três vias responsáveis pelo catabolismo das proteínas no músculo esquelético: o sistema lisossomal, o qual é responsável predominantemente pela quebra de proteínas extracelular, como os receptores de membrana; o sistema citosólico ativado pelo cálcio independente de ATP, o qual pode representar papel importante na destruição tecidual, necrose e autólise; e o sistema ubiquitina-proteossoma ATP dependente, o qual se acredita ser o responsável pela quebra do

conjunto de proteínas intracelulares no músculo esquelético (LECKER et al. 1999). Este envolve a ligação de várias ubiquitinas ligadas à proteína alvo, formando uma cadeia poliubiquitinada que leva a degradação no proteossoma 26S, um complexo proteolítico com múltiplas subunidades (ADAMS, 2004) (FIGURA 2). Khal et.al. (2005) observaram que a expressão da subunidade do proteossoma em músculo esquelético era maior em pacientes com câncer e que tinham grande perda de peso quando comparada àqueles pacientes que apresentavam insignificante perda de peso.

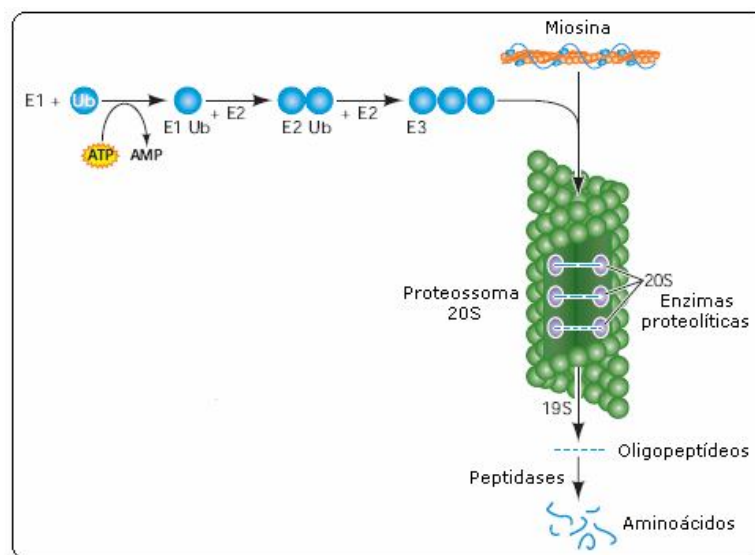


FIGURA 2 – Sistema proteolítico Ubiquitina-proteossoma ATP dependente.

Citocinas também atuam promovendo catabolismo tecidual (TISDALE, et.al., 2005). Estudos sugerem que a ação das citocinas na indução da perda de massa muscular difere do tipo do tumor e do local onde encontra-se instalado (BARACOS, 2000). TNF induz ao aumento na expressão do gene para ubiquitina, aumentando a expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), mesma via de atuação do fator indutor de proteólise (PIF) (GORDON, et.al., 2005). A inibição da síntese ou bloqueio da ação periférica de citocinas como TNF e IL-6 em ratos portadores de hepatoma de Yoshida AH-13 previne a perda de massa muscular e significativa redução da proteólise através da inibição da via proteolítica ubiquitina-proteossoma (COSTELLE et.al., 2002).

1.6 Fator indutor de proteólise

Fator indutor de proteólise (*Proteolysis Inducing Factor*) é uma glicoproteína sulfatada de 24kDa com núcleo protéico e extensivas glicosilações em resíduos de asparagina e serina, tendo seu efeito biológico relacionado às cadeias oligossacarídeas sulfatadas (LORITE et.al., 2001). O PIF foi inicialmente isolado de ratos com tumor MAC16 e na urina de pacientes com câncer com caquexia e que apresentavam grande degradação de proteína muscular pelo aumento da expressão de componentes-chaves da via proteolítica ubiquitina-proteossoma (TODOROV, et.al.; 1996). Khal et.al. (2005) observaram que pacientes que apresentavam grande quantidade de PIF na urina tinham grande perda de peso e conseqüentemente maior expressão das subunidades da via proteolítica ubiquitina-proteossoma ATP dependente no músculo esquelético.

Esse aumento da expressão da via proteolítica está relacionado com a degradação da proteína inibitória do NF- κ B, o I κ B. O NF- κ B é um fator de transcrição que, uma vez livre de sua proteína inibitória, segue para o núcleo onde regula a transcrição de diversos genes, entre eles a transcrição de componentes do sistema proteolítico em questão (GORDON et.al.; 2005). Além disso, NF- κ B livre inibe a síntese protéica através da inibição do fator de transcrição MyoD, responsável pelo aumento da síntese (FIGURA 3).

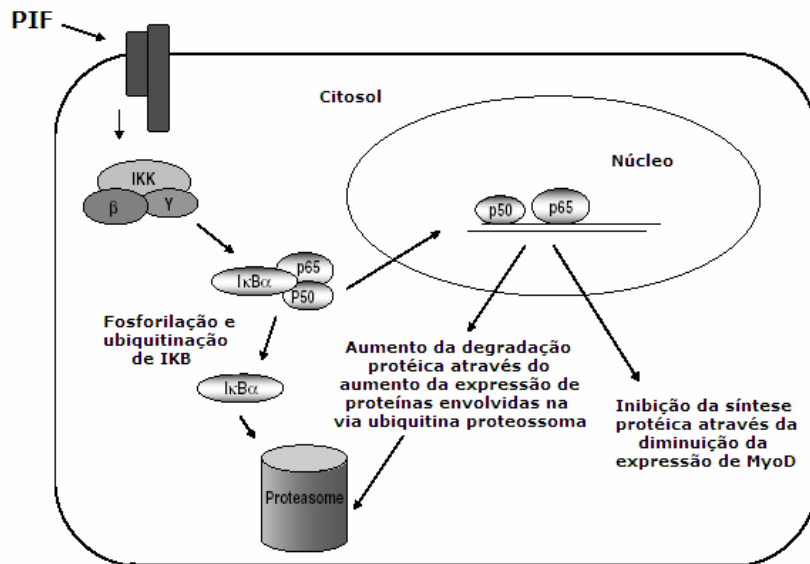


FIGURA 3 – Ativação do NF-κB no músculo esquelético pelo PIF.

1.7 Apoptose celular, câncer e proteínas envolvidas

Morte celular programada pode ocorrer de duas formas, necrose e apoptose. Apoptose é caracterizada pela perda do volume celular, formação de rugas na membrana plasmática, condensação nuclear e agregação da cromatina (ESCARCEGA et. al., 2007; ZHOU et. al., 2006). Durante os estágios iniciais de apoptose, a fosfatidilserina é translocada da membrana plasmática interna para externa, servindo como marcador para fagocitose. Apoptose pode ser induzida em inúmeras condições, como irradiação, choque térmico, estresse oxidativo, hipóxia e privação de nutrientes (FUCHS, BODE, 2006). O balanço entre apoptose e sobrevivência é mantido dentro da célula pelas proteínas da família da Bcl-2. Esta família é dividida em três subfamílias: Bcl-2, que inclui Bcl-2 e Bcl-xL, BAX, que inclui Bax e Bak e a subfamília das proteínas “BH3-only” que inclui Bad e Bid (GROSS, et.al.; 1999).

As enzimas típicas envolvidas no processo de apoptose são as enzimas proteolíticas denominadas caspases, divididas em caspases de iniciação (8 e 10) e de execução (3, 6 e 7). As caspases 3, 6 e 7 são ativadas pela ação das caspases 8 e 10 e pela presença do citocromo c; este é liberado pela mitocôndria que interage

com adenosina trifosfato (ATP), fator ativador de apoptose 1 (apaf-1) e pró-caspase 9 que são ativadas pela formação do apoptossomo levando a apoptose (HUERTA et. al., 2006) (FIGURA 4).

Existem duas vias que levam a apoptose celular: extrínseca, através da morte do receptor e intrínseca, via mitocondrial (FIGURA 4) (ESCARCEGA et. al., 2007; ZHOU et. al., 2006). A via intrínseca é mediada pela família de proteínas Bcl-2, sendo as proteínas pró-apoptóticas promovendo permeabilidade da membrana mitocondrial e anti-apoptóticas inibindo esses efeitos e a liberação do citocromo c (BAGCI et al., 2006). A via extrínseca esta relacionada com a morte de receptor onde o resultado é o recrutamento de múltiplas pró-caspases que clivam e ativam outras (BAGCI et al., 2006).

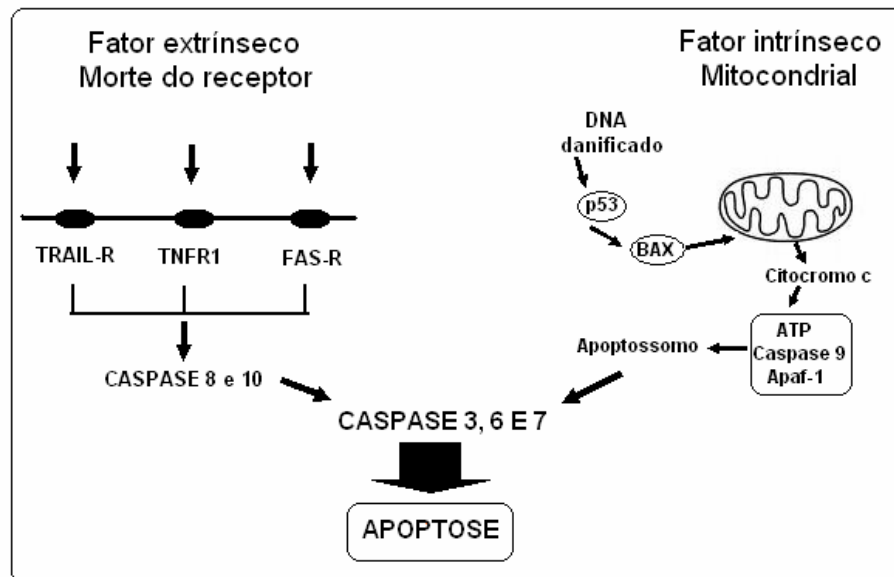


FIGURA 4 - Mecanismos da apoptose celular

A apoptose têm sido alvo em terapias contra o câncer. A intervenção na ação de moléculas anti e pró apoptóticas é fator importante para impedir o ciclo celular (HUERTA et. al., 2006). O aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como BAX, BAD e Bcl-x, e modulação das proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, podem ter resultados positivos com relação à diminuição do crescimento tumoral

(FLEISCHER et. al.,2006). Watson et. al. (1996) mostraram que indivíduos com câncer de cólon tinham diminuição da sobrevida quando o tumor apresentava baixos níveis de expressão da bax.

A peroxidação lipídica é importante por inibir o crescimento e aumentar a apoptose de células tumorais e esta relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (NEUZIL et. al., 2006). O processo de peroxidação lipídica consiste do ataque de alguma espécie que possui reatividade suficiente para desviar um átomo de hidrogênio da molécula de ácido gráxo insaturado da membrana celular (LU, 2007). O exercício físico é um grande estímulo para produção dessas substancias, pois durante a sua prática ocorre aumento do consumo de oxigênio, sendo que 4 a 5% desse oxigênio não é completamente reduzido à água, formando espécies reativas de oxigênio (DOMINGUES et. al.,2006). Como células cancerosas possuem menor defesa antioxidante do que células normais podem então, sofrer mais com a presença dessas substancias oxidantes, levando ao aumento na taxa de peroxidação lipídica e aumento da translocação de bax para mitocôndria, ocorrendo maior mobilização citosólica de citocromo c (NEUZIL et. al., 2006). O aumento da produção de peróxido de hidrogênio, substrato para formação do radical hidroxila, está relacionado com aumento na taxa de peroxidação lipídica e conseqüentemente diminuição da taxa de crescimento tumoral (LU, 2007). Radak et. al. (2002) observaram que ratos que praticavam exercício antes e depois da implantação do tumor tinham menor velocidade de crescimento tumoral comparado àqueles que só praticavam exercício antes da inoculação ou eram sedentários, mostrando também que a quantidade de peroxidação lipídica estava aumentada quando o tumor era menor.

1.8 Metabolismo da glutamina

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma, no músculo e em alguns tecidos. No músculo seu conteúdo intracelular corresponde a 50-60% do total de aminoácidos livres e no plasma aproximadamente 25% do total (GRIFFITHS,2001; FÜRST, et.al.; 2004). É classificado como aminoácido condicionalmente essencial, pois em situações de grande estresse ocorre aumento

da sua demanda fisiológica e diminuição da capacidade do organismo em conter essa demanda (FUCHS; BODE, 2006; GRIFFITHS, 2001). Por isso, a sua suplementação, tem sido postulada como importante imunomodulador em várias doenças ou situação de estresse catabólico (JOYNER, 2005).

Este aminoácido é de extrema importância para o metabolismo celular, pois está envolvido em diversos processos fisiológicos como na transferência de nitrogênio entre órgãos, aproximadamente um terço de todo nitrogênio derivado do metabolismo protéico é transferido na forma de glutamina (BIOLO et. al., 2005), na manutenção do balanço ácido base durante acidose (YOSHIDA et. al., 2001), na desintoxicação de amônia, como regulador direto da síntese e degradação de proteínas utilizadas para crescimento e diferenciação celular, como precursor de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos necessários na produção de DNA e RNA, no fornecimento de energia para as células de rápida proliferação, como por exemplo células do sistema imunitário e enterócitos (NEWSHOLME; LIMA, 2003; BIOLO et. al., 2005; FÜRST, et.al.;2004) e como precursor para síntese de glutathione, importante enzima antioxidante que protege a célula do estresse oxidativo (ROTH et.al.; 2002; FÜRST, et.al.; 2004).

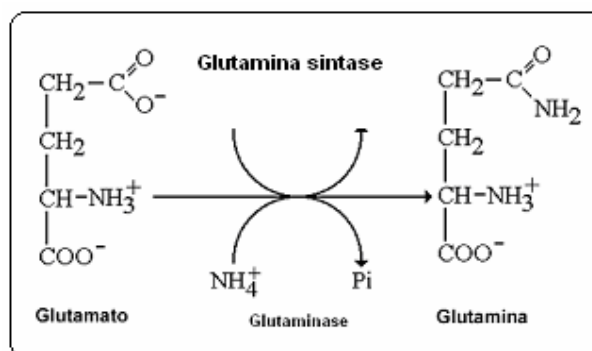


FIGURA 5 - Síntese e degradação da glutamina e as enzimas atuantes.

A glutamina é sintetizada pelo organismo humano pela enzima glutamina sintase, que é essencial na regulação do metabolismo celular do nitrogênio. Essa enzima catalisa a conversão de glutamato em glutamina, usando amônia como fonte de nitrogênio (CURI, 2000; DI PASQUALE, 1997) (FIGURA 5). A glutamina sintase está presente em quantidades significativas no músculo esquelético,

pulmões, cérebro e possivelmente no tecido adiposo (CURI, 2000; NEWSHOLME; CALDER, 1997). Desses tecidos, o muscular pode ser considerado o mais importante, pois ele além de sintetizar a glutamina, também estoca e regula a concentração de glutamina plasmática (NEWSHOLME; CALDER, 1997). Segundo Newsholme et.al. (2003) o músculo esquelético é responsável por 90% do total de glutamina corporal. A figura 6 mostra a distribuição de glutamina no organismo em condições normais.



FIGURA 6 - Representação esquemática do fluxo de glutamina entre órgãos no estado alimentado e em condições normais.

Os tecidos que mais consomem glutamina são o sistema imunitário, rins, intestino e em algumas ocasiões, o fígado (CURI, 2000). Sua degradação é realizada através da enzima glutaminase que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato; essa oxidação parcial é chamada glutaminólise, que é a primeira reação que ocorre para que esse aminoácido seja utilizado (CURI,2000; DI PASQUALE, 1997; NEWSHOLME; CALDER, 1997; ALPERS,2006). Após a produção de glutamato, ocorrem inúmeras reações bioquímicas específicas como a sua conversão a ácido butírico amino γ (GABA), ornitina, 2-oxoglutarato, glicose e glutatona (NEWSHOLME, et.al.; 2003) (FIGURA 7)

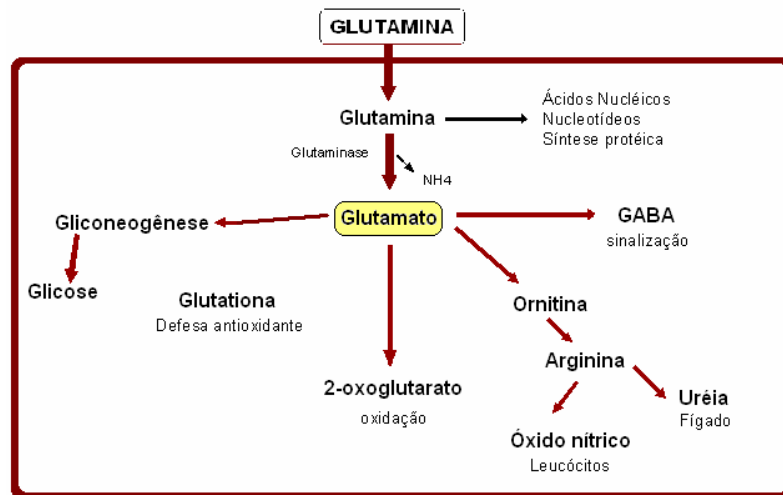


FIGURA 7 – Reações que envolvem o glutamato

1.9 Metabolismo da glutamina e sua relação com processos neoplásicos

A imunossupressão e o hipercatabolismo estão freqüentemente associados a doenças malignas, sendo este estado relacionado a uma diminuição das concentrações plasmáticas de glutamina devido a acelerada liberação desse aminoácido do músculo e de severa depleção em todos os tecidos (JING-XIANG, et.al.; 2004; KLIMBERG et. al., 1990). Nesta situação o músculo esquelético e possivelmente o pulmão são os principais sítios produtores de glutamina. Há intenso consumo pelos leucócitos (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) e tecido tumoral, que por sua vez, possui alta atividade da enzima glutaminase. Além desses, no entanto, o fígado, rim e epitélio intestinal também utilizam glutamina em menor intensidade. O avanço do tumor resulta na depleção da glutamina muscular e conseqüentemente perda de peso com grande perda de massa muscular (JEPSON et. al., 1988). A figura 8 representa esquematicamente o fluxo de glutamina entre órgãos em processos neoplásicos (CURI, 2000; GRIFFITHS, 2001).

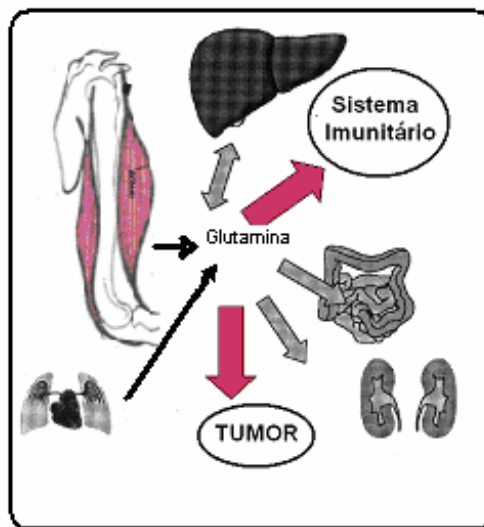


FIGURA 8 - Representação esquemática do fluxo de glutamina entre órgãos no processo neoplásico. A espessura das setas indica o grau comparativo de utilização do aminoácido.

JING-XIANG et al. (2004) observaram que o balanço nitrogenado em pacientes com câncer, que recebiam nutrição parenteral, era negativo no pós-operatório. Os pacientes que receberam suplementação com glutamina dipeptídeo, tiveram balanço nitrogenado positivo. Ainda, o estudo demonstrou que a suplementação parenteral de glutamina aumenta a atividade das células imunitárias. BIOLO et. al. (2006) mostraram aumento da síntese protéica e do fluxo de glutamina em pacientes com câncer, após cirurgia, que receberam uma mistura enriquecida com aminoácidos de cadeia ramificada, aminoácido precursor da glutamina.

Recentes estudos têm sugerido que a glutamina pode ser substrato importante para o crescimento e desenvolvimento do tumor através da promoção do crescimento tumoral e supressão da apoptose nessas células (FUCHS, BODE, 2006). Segundo Roth et.al. (2002), a suplementação com glutamina em pacientes com câncer pode aumentar a atividade do sistema imunitário contudo, ocasionar o aumento da proliferação de células tumorais e reduzir a apoptose. Carreteo et.al. (2000), observaram que o crescimento tumoral em ratos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, suplementados com glutamina, era similar àqueles que não recebiam suplementação, porém a suplementação foi capaz de manter as

concentrações plasmáticas de glutamina. Ainda, no mesmo estudo, suplementação provocou aumento da concentração citosólica da célula tumoral de glutamato, que foi relacionada com inibição do transporte de glutamina para mitocôndria, aumentando a suscetibilidade de estresse oxidativo e conseqüentemente aumento da apoptose nestas células tumorais. Experimentos *in vivo* demonstraram que a administração de glutamina, via oral ou endovenosa, não acelera o crescimento de tumores (FAHR et. al., 1994).

Em pacientes com câncer, a permeabilidade da membrana intestinal pode aumentar, debilitando a barreira da mucosa e predispondo o paciente a maiores complicações. Suplementação com glutamina tem mostrado redução da permeabilidade da membrana da mucosa intestinal. Isto mantém sua estrutura, prevenindo a redução da secreção intestinal de IgA, que conserva a concentração de imunoglobulina, a estrutura e função intestinal e conseqüentemente, melhora o sistema imunitário (SACKS et. al., 2003).

1.10 Glutamina e sistema imunitário

Devido à alta taxa de proliferação e de uma variedade de síntese e secreção de peptídeos, as células imunitárias utilizam grandes quantidades de nutrientes (NEWSHOLME; CALDER, 1997). Linfócitos e macrófagos utilizam tanto glicose como glutamina para gerar energia, sendo o índice de utilização de glutamina similar ou até maior que da glicose (CALDER, 1994). Essas células de defesa possuem alta atividade da glutaminase; acredita-se que tanto linfócito B quanto linfócito T utilizam glutamina na mesma intensidade. Decréscimo na concentração plasmática de glutamina leva ao decréscimo da proliferação de linfócitos em humanos (CHANG, 2002) e diminuição da fagocitose em macrófagos de ratos (CALDER, 1994). Parry-Billings et.al. (1990) sugerem que pequena diminuição, aproximadamente 10%, na concentração plasmática de glutamina, leva a maiores prejuízos na função imunitária.

A glutamina modula a ativação de linfócitos, aumentando a proliferação dos mesmos, além de aumentar a produção de IL-2. A suplementação está relacionada com diminuição da taxa de apoptose de linfócitos correlacionada com aumento da

expressão da proteína Bcl-2 e diminuição da caspase 3 e 8 (CHANG et.al.; 2002). A alta taxa de glutaminólise em linfócitos tem sido considerada importante no fornecimento de ótimas condições para síntese de purinas e pirimidinas, nucleotídeos e de lipídeos, em período específico do ciclo celular (COLLINS et. al., 1998).

A atividade fagocitária dos macrófagos está relacionada ao extermínio de células tumorais e normais que por ventura vieram a morrer, utilizando altas taxas de glutamina para biossíntese de lipídeos de membrana e nucleotídeos (CURI, 2000). Essas células apresentam grande capacidade de captar glutamina, mantendo-a por um certo período como glutamato, atuando como um estoque intracelular para a geração de energia e fornecendo precursores para os processos biossintéticos (NEWSHOLME, 1989).

A suplementação com glutamina pode evitar quedas na concentração plasmática e muscular da mesma, melhorando a atividade das células imunitárias. Estudos envolvendo atletas observaram que a suplementação com glutamina foi capaz de manter as suas concentrações plasmáticas normais melhorando a resposta imunitária, como redução da taxa de apoptose de neutrófilo e consequentemente diminuindo o nível de infecções (LAGRANHA, et.al.; 2004, CASTELL, et.al.; 1997). A suplementação com glutamina, em ratos, após exercício exaustivo, aumentou a concentração plasmática de glutamina com aumento também na sua concentração intramuscular (ROGERO et. al.,2006).

1.11 Atividade física e sistema imunitário

O exercício, dependendo de sua intensidade, pode prejudicar ou melhorar a atividade do sistema imunitário. A relação entre exercício e suscetibilidade à infecções tem sido ilustrada no modelo de curva em “J” (NIEMAN, 1994) (FIGURA 9). Exercício com intensidade moderada oferece proteção contra diversas doenças por potencializar a ação do sistema imunitário (PEDERSEN, TOFT, 2000). Porém, exercício que possui característica intensa parece aumentar a suscetibilidade à infecções (SANTOS et.al., 2007).



FIGURA 9 – Relação da intensidade do exercício e susceptibilidade a infecções virais

Os mecanismos envolvidos com as alterações imunitárias durante a prática de atividade física não são bem elucidados, porém parece ser algo multifatorial que incluem mudanças endócrinas e alteração na concentração plasmática de glutamina (CASTELL, et.al, 2003). Após exercício físico intenso e prolongado, a concentração plasmática de glutamina diminui, relacionando-se com aumento do número de infecções (CASTELL, 2003), provavelmente devido ao prejuízo na síntese de anticorpos, queda na atividade de neutrófilos e macrófagos e na taxa proliferativa de linfócitos (PEDERSEN; GOETZ, 2000). Aumento da concentração de hormônios como adrenalina, noradrenalina, hormônio do crescimento e cortisol podem afetar diretamente o número de linfócitos e neutrófilos (PEDERSEN, TOFT, 2000). Santos et.al. (2007), observaram que ratos que exercitavam-se intensamente tinham diminuição na concentração plasmática de glutamina, porém sem prejuízos na proliferação de linfócitos.

Os efeitos agudos do exercício no sistema imunitário incluem aumento na concentração de neutrófilos durante e após o exercício moderado e de todas as linhagens de linfócitos como as células T e B e a célula *Natural Killer* (NK) (PEDERSEN; GOETZ, 2000). O aumento de linfócitos se dá devido ao recrutamento de todas as sub-populações no sangue, células T CD4, T CD8, B CD19 e NK, aumentando em número durante o exercício e declinando após exercício intenso em apenas 1 hora (PEDERSEN, TOFT, 2000).

Indivíduos que praticam atividade física regular geralmente possuem imunidade natural aumentada comparada à de indivíduos sedentários. Com relação à liberação e concentração de citocinas, o quadro de um indivíduo com sepse ou durante a prática de atividade física difere apenas na liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias (FIGURA 10). Em situação de sepse, observa-se aumento da concentração de citocinas como TNF e IL-1, consideradas citocinas pró-inflamatórias, o que não é observado durante a prática de exercício. O que se observa em comum entre a prática de exercício físico e sepse é o aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-6 principalmente, mostrando que a atividade física possui importante ação anti-inflamatória (PEDERSEN, PEDERSEN, 2005).

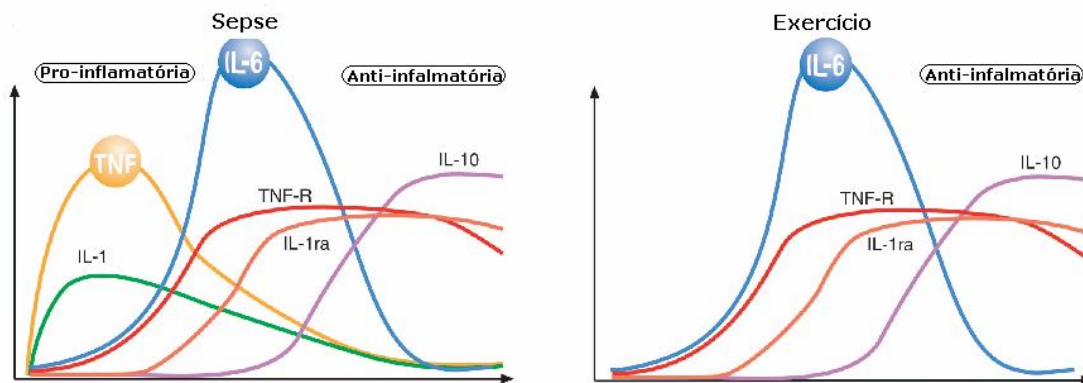


FIGURA 10 – Liberação de citocinas em situação de sepse e de exercício.

1.12 Atividade física e câncer

Mudanças de comportamento durante a vida como a prática regular de atividade física e adoção de hábitos alimentares saudáveis são fatores significativos para prevenção e tratamento do câncer. Estudos epidemiológicos têm mostrado que aumento na prática de atividade física está associado a decréscimo no risco de câncer de cólon e de mama (LEE, 2003; FRIEDENREICH; ORENSTEIN, 2002) e possivelmente contra outros tipos de câncer como próstata, pulmão e endométrio (FRIEDENREICH; ORENSTEIN, 2002). Para diminuir o risco de várias doenças, inclusive o câncer, o Colégio Americano de Medicina do Esporte e o Centro de

Controle e Prevenção de Doenças, recomendam à pessoas adultas que realizem 60 minutos de exercício físico intenso ou 150 minutos de exercícios físico moderado por semana (PATE et. al., 1995).

O estilo de vida sedentário tem sido associado ao aumento de diversos tipos de câncer, especialmente de mama e de cólon. A obesidade, geralmente consequência de uma vida sedentária, também está intimamente relacionada com o aumento do risco de câncer do endométrio, pâncreas, rim, vesícula biliar e esôfago (BYERS et. al., 2002). Courneya et al (2005) observaram que 72% dos indivíduos que apresentavam câncer do endométrio estavam acima do peso e muitos desconheciam um bom programa de atividade física.

Vários fatores relacionam a atividade física com diminuição do risco em desenvolver câncer, em virtude de alterações no metabolismo hormonal, principalmente nos hormônios esteróides, insulina e fatores de crescimento, na geração de radicais livres, nas mudanças da composição corporal e também nos efeitos diretos no tumor (WESTERLIND et. al., 2003). Ainda, a atividade física com intensidade moderada pode melhorar a atividade de algumas células imunitárias (PEDERSEN; GOETZ, 2000). Os efeitos agudos do exercício no sistema imunitário incluem aumento na concentração de neutrófilos durante e após o exercício moderado e de todas as linhagens de linfócitos como as células T e B e NK (PEDERSEN; GOETZ, 2000).

Durante uma sessão de treinamento de força ocorre uma série de reações fisiológicas que elevam a síntese protéica no tecido muscular esquelético provocando aumento da massa muscular (BARACOS, 2001). Como em pacientes com câncer ocorre grande proteólise, o exercício de força poderia aumentar a síntese protéica, diminuindo a perda de massa magra. Segal et al (2003) relataram que atividade física de resistência, em homens com câncer de próstata durante 12 semanas e que faziam tratamento para doença, foi suficiente para melhorar a qualidade de vida e diminuir a fadiga desses pacientes, melhorando também a aptidão muscular.

Apesar de grandes prejuízos físicos e emocionais causados num paciente com câncer a atividade física durante o tratamento pode ser benéfica para sua reabilitação, mas, infelizmente, ainda não é componente comum a ser procurado

(OLDERVOLL et. al., 2004). O exercício parece melhorar a qualidade de vida em vários pacientes com câncer (COURNEYA et. al., 2003; YOUNG-McCAUGHAN et. al., 1991; OLDERVOLL et.al., 2004), favorecendo outros aspectos como aumento da aptidão física, capacidade aeróbia e muscular (OLDERVOLL, et.al., 2004), maior controle dos efeitos colaterais do tratamento, redução do risco de outras doenças crônicas, diminuindo os sintomas do estresse, melhorando a imagem corporal (COURNEYA et. al., 2005), aumento da síntese protéica e conservação da massa muscular (BURNHAM , 2002) podendo auxiliar no tratamento (COURNEYA et. al., 2003). Pacientes em tratamento relatam que a prática de atividade física os auxiliam a esquecerem a doença e o tratamento (COURNEYA et. al., 1997), a manterem um estilo de vida normal e saudável (COURNEYA et. al., 1997; COURNEYA et. al., 2003; SEGAL et. al., 2003, BURNHAM et. al., 2002), fazendo com que se sintam melhor. Porém existem alguns obstáculos relatados pelos pacientes quanto à prática de exercício durante o tratamento de câncer como fadiga, náusea, diarreia, falta de tempo e suporte, dor, falta de conselho e prescrição (COURNEYA et. al., 1997). O exercício deve levar em consideração o local onde o tumor está instalado, estágio da doença, tipo de treinamento, estado físico atual e ao longo da vida e outros fatores (COURNEYA et. al., 2004). Estima-se que a atividade física pode reduzir o risco de neoplasias em até 30 a 40%, sendo necessário de 30 a 60 minutos de atividade física diária, com intensidade moderada, para que o risco decline (LEE, 2003). O tipo, intensidade e duração do exercício são fatores importantes no tratamento. A maioria dos trabalhos mostra que exercício com duração de até 30 minutos com intensidade moderada, independente do tipo, parece oferecer algum tipo de benefício.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é o maior problema de saúde pública dos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, sendo responsável por aproximadamente 7,6 milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 13% de todas as causas de morte do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). A maioria dos casos de câncer (80%) está relacionada a fatores ambientais, por isso, mudanças no comportamento das pessoas podem agravar a incidência da doença, devendo-se dar importância à prevenção primária como o controle do uso do tabaco, redução do consumo de álcool, estímulo a dieta com qualidade nutricional e a prática de atividade física regular (ADAMI et. al., 2001).

Cerca de metade dos pacientes com câncer apresentam a síndrome da caquexia (TISDALE, 2004). Essa síndrome se acentua com o progresso da doença, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes com tumor maligno avançado, ocorrendo gradativa perda de peso, principalmente de massa muscular esquelética, deixando o hospedeiro mais debilitado e diminuindo seu tempo de vida do mesmo (ROSS; FEARON, 2002). Devido ao aumento significativo de mortes em pacientes portadores de câncer, aumentou também a preocupação com relação a métodos de prevenção e tratamento da doença. Alteração no hábito de vida, como iniciar um programa de atividade física, pode ser fator crucial para evitar o aparecimento do câncer ou melhorar o estado do paciente doente. Em estudo epidemiológico relacionando a atividade física e o risco de desenvolver câncer foi demonstrado que pessoas fisicamente ativas têm redução de 30 a 40% no risco do aparecimento do câncer de colón, quando comparadas a pessoas inativas (LEE, 2003). O exercício leva à alterações benéficas no organismo como mudança do metabolismo hormonal e da composição corporal (WESTERLIND et. al., 2003) melhorando a atividade de algumas células imunitárias (PEDERSEN; GOETZ, 2000). Por isso a atividade física, além de ajudar na prevenção da doença, pode ser um tipo de intervenção utilizada como coadjuvante no tratamento do câncer (PEDERSEN; GOETZ, 2000).

A concentração de glutamina plasmática encontra-se abaixo do normal em doenças malignas avançadas, o que leva ao estado catabólico, provocando

acelerada liberação de glutamina do músculo e severa depleção de glutamina em todos os tecidos (KLIMBERG et. al., 1990). Com o avanço do tumor acontece a depleção da glutamina muscular e conseqüentemente diminuição de peso com perda de massa muscular (JEPSON et. al., 1988). Ainda, a glutamina é um dos principais combustíveis para as células do sistema imunitário, e queda na sua concentração plasmática, poderia levar a imunossupressão no paciente (PARRY-BILLINGS et. al., 1990, NEWSHOLME, 1999).

Trabalhos prévios do nosso laboratório têm demonstrado que ratos portadores do tumor de Walker 256, quando submetidos ao protocolo de treinamento de saltos, durante 8 semanas, apresentam redução da proliferação das células do tumor de Walker 256 “ex vivo” e do crescimento tumoral “in vivo” (NUNES, 2005; KUCZERA, 2007; PESSINE, 2007); a suplementação com glutamina em ratos que foram submetidos a um treinamento intenso e de longa duração foi capaz de evitar alguns prejuízos dos parâmetros imunitários entre esses a resposta fagocítica de macrófagos (LISSA, 2004). Contudo, não há relatos do efeito da associação do treinamento de força e da suplementação de glutamina em indivíduos portadores de tumor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do treinamento de salto associado à suplementação com glutamina sobre parâmetros de caquexia, crescimento tumoral e identificar os possíveis mecanismos envolvidos no crescimento das células tumorais e atividade do sistema imunitário, em ratos portadores do tumor de Walker 256.

3.2 Objetivos específicos

Analisar os seguintes parâmetros:

- Evolução da massa corpórea dos indivíduos;
- Parâmetros de caquexia: concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, glutamina, glicemia, lactacidemia e conteúdo de glicogênio hepático;
- Peso tumoral e da carcaça;
- Proliferação de células tumorais “*ex vivo*”;
- Apoptose e necrose de células tumorais por citometria de fluxo;
- Lipoperoxidação no tecido tumoral;
- Expressão de BAX, Bcl-2 e PIF no tecido tumoral; por western blotting
- Proliferação de linfócitos T “*ex vivo*”.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Este estudo possui delineamento do tipo experimental. Para cada experimento, 160 ratos foram proporcionalmente divididos em oito grupos: Sedentário sem suplementação (S), sedentário suplementado com glutamina (SG), Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor e suplementado com glutamina (SWG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). A distribuição foi intensional de modo a se obter grupos homogêneos quanto ao peso corporal. Após seis semanas de treinamento de saltos, 1mL de solução contendo 3×10^7 células do tumor de Walker 256 foi inoculada subcutaneamente no flanco direito dos animais. Após 15 dias da inoculação do tumor, coincidindo com a oitava semana de treinamento, os animais foram ortotaniados para coleta e análise dos tecidos.

4.2 Amostra

Foram utilizados ratos machos albinos adultos (70 dias) da linhagem Wistar mantidos em ciclo claro/escuro (22h/10h) e temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) com livre acesso a comida e água. Os animais foram obtidos no Biotério do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba, PR.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

4.3 Protocolo de Treinamento

Foi realizado um período de adaptação ao meio líquido (1/2 hora de natação por dia durante 3 dias, sem utilização de carga). Após esse período, os animais dos

grupos exercitados realizaram programa de exercício que constituiu de saltos em tanque com água, com sobrecarga equivalente à 50% do peso corporal de cada animal (atualizada semanalmente), acoplada ao tórax. A sessão de treinamento constituiu na realização de 10 séries com duração de 30 segundos e com intervalo de 1 minuto entre cada série. Foram feitas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso nas quartas-feiras e fins de semana, durante o período de 8 semanas. Após a inoculação das células tumorais, na sexta semana não houve aumento da carga e o treinamento continuou por mais duas semanas.

A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C. Os saltos foram realizados em tubo de PVC com 250mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo dessa forma o salto. A profundidade da água foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (ROGATTO; LUCIANO, 2001, adaptado).

4.4 Suplementação com glutamina

A suplementação com glutamina iniciou após a inoculação do tumor. A suplementação foi diária e realizada logo após a sessão de treinamento. A dose utilizada foi equivalente a 0,125g/kg de glutamina, da marca Nuteral, logo após o treinamento através de sonda orogástrica (gavagem) durante a sétima e oitava semana de experimentação.

4.5 Determinação do peso corpóreo e dos tumores

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias no período da manhã, utilizando - se balança Urano (precisão 0,01g). O tumor foi pesado em balança Denver Instrument XL-410 (precisão 0,0001g).

4.6 Procedimento de ortotanásia

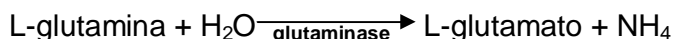
Após 8 semanas de treinamento coincidindo com o 15º após a implantação do tumor, foi realizada a ortotanásia dos animais com o auxílio de guilhotina. Este método foi utilizado para facilitar a retirada de grande volume sangue, necessário para análise sérica.

4.7 Parâmetros Bioquímicos

4.7.1 Mensuração plasmática de glutamina

A determinação de glutamina plasmática foi realizada segundo a metodologia descrita por LUND (1985). A determinação de L-glutamina no plasma foi realizada em duas etapas:

Reação A: desaminação da L-glutamina para L-glutamato



Reação B: desidrogenação do L-glutamato para α -cetoglutarato acompanhada pela redução do $\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{glutamato desidrogenase}} \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH}$

A conversão de NAD^+ para NADH foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm, sendo esta conversão proporcional à quantidade de L-glutamina inicial.

4.7.2 Mensuração plasmática da glicemia

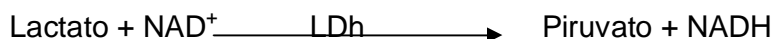
A glicose foi quantificada por método colorimétrico, utilizando-se sistema comercial Glicose E enzimática da labtest. Os ensaios foram realizados segundo as instruções do fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) a 505 nm.

4.7.3 Mensuração plasmática dos Triacilgliceróis

Foi determinado pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o sistema comercial TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante, e após a leitura da absorbância em 540nm, a concentração de triacilgliceróis foi expressa em mg/dL.

4.7.4 Mensuração plasmática do lactato

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionado 2 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH / TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100 µL do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD⁺ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Segundo a reação:



A partir da medida da absorbância, foi calculada a concentração do lactato sérico em µmol/mL, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{D. O.}}{6,22} \times \frac{V1}{V} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{V4}{V5}$$

[Lactato] = concentração de lactato produzida

D. O. = densidade ótica

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteínizado

Tampão de Ensaio (para 100 mL de H ₂ O destilada)	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 mL
LDh	0,4 mL
NAD ⁺	60 mg
pH	8,85

4.8 Determinação do glicogênio hepático

O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo LEIGHTON *et al.* (1989) adaptado. O fígado, aproximadamente 90 mg, foi retirado e colocado em tubos de ensaio contendo 500 µL de KOH 1M e deixado em banho a 60 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Após o banho, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e pipetadas 100 µL em eppendorfs contendo 17,5 µL de ácido acético glacial e 500 µL de tampão acetato contendo amiloglicosidase 0,1%, e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 3 horas. Ao final deste período centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 15000 g, e 100 µL de cada amostra foi colocada em novos tubos de

ensaio contendo 1 mL do tampão Trietanolamina (TEA) e hexokinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Após 40 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

4.9 Metodologias para ensaios envolvendo células do tumor de walker

4.9.1 Implantação do tumor

O tumor de Walker 256 foi identificado por George Walker em 1928, no John's Hopkins University School of Medicine, em glândulas mamárias de uma rata grávida. Em 1953 e 1954 esse tumor foi transplantado em ratos por inoculação subcutânea. O tumor de Walker 256 apresenta 2 subtipos: tipo A metastisante que leva a caquexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástases e induz a caquexia precoce do portador, levando a morte em 15 dias (FERNANDES, 1995). Nos experimentos foram utilizados matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, cedido gentilmente pelo Professor Dr. Rui Curi, ICB – USP, mantido pelo Laboratório de Metabolismo Celular.

Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto uma suspensão de 3×10^7 células/mL do tumor de Walker 256. Após um período de cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotanasiado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, foi massageado seu abdome, e através de laparotomia mediana, foi coletado da cavidade abdominal, com pipeta Pasteur de plástico, o fluido contendo as células tumorais. Foi feita a contagem do número de células tumorais utilizando-se câmara de Neubauer. Após a contagem, 3×10^7 células (em 1 mL de solução) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito nos animais em experimentação por volta da sexta semana de treinamento.

4.9.2 Cultivo das células tumorais

Após realizar todo o procedimento para isolamento das células tumorais, como descrito previamente, estas foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato (PBS) contendo antibiótico (2,5 U/mL de penicilina e 2,5 µg/mL estreptomicina,

concentração final) e transferidas para tubos estéreis (50 mL). Após a quarta lavagem, as células estavam em condições estéreis e foram ressuspensas em meio RPMI -1640 contendo 10% de soro fetal bovino, antibiótico e 20 µl de uma solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 µCi/poço) para incorporação no DNA. Essas (2 x 10⁵ células/mL) foram então cultivadas por 24h a 37° C em atmosfera de 95% ar / 05% CO₂.

Após este período, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para frascos contendo 1 mL de líquido de cintilação e foram levados para mensuração em contador Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm).

4.9.3 Produção de lipoperóxidos

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por Nourooz-Zadeh et.al. (1994). Este método quantifica a formação de hidroperóxido por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja.

Duzentos gramas de amostra de tumor de Walker 256 foram homogeneizados em 1ml de metanol e centrifugados a 5000G por 5 minutos a 4°C. Para cada amostra, alíquotas de 90 µl do sobrenadante foram postas em 6 tubos de centrífuga (1,5 ml de capacidade). Três destes tubos foram adicionados 10 µl de solução metanólica de TPP (trifenilfosfina) 10 mM, para haver a redução seletiva de hidroperóxidos. As amostras contidas nos três tubos restantes receberam apenas 10 µl de metanol. Todos os tubos foram agitados e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada esta incubação, adicionou-se a cada tubo 900 µl do reagente FOX2 (xilenol laranja 100 µM, hidroxitolueno butilado 400 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250 em metanol 90%). Após agitação, o

meio reacional foi incubado em temperatura ambiente por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 560nm.

Para a determinação da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorvância das amostras tratadas com TPP, do valor da absorvância das amostras sem TPP. O valor obtido foi então interpolado na curva padrão de peróxido de hidrogênio, a qual foi obtida com soluções padrão de peróxido de hidrogênio, de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 μM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/ml) pela concentração de proteínas (mg/ml), obtendo-se assim o valor de hidroperóxidos por quantidade de proteínas no sobrenadante do extrato (nmol de hidroperóxidos / mg de proteínas).

4.9.4 Quantificação protéica para dosagem de lipoperóxido

Amostras de 200mg de tumor foram homogeneizadas em metanol na proporção de 1:5 com auxílio de homogeneizador de tecidos, centrifugadas por 5 minutos a 5000G e o sobrenadante coletado para quantificação protéica.

A quantificação de proteína foram mensuradas pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, calculada com base em curva padrão de proteína conhecida. Foram plaqueados 250 μL de solução de Bradford e 10 μL de cada um dos padrões ou das amostras (4 réplicas) em placas de 96 poços, sendo a leitura realizado no leitor de microplacas (Bio-Rad Microplate Reader – Benchmark) a 595nm.

4.9.5 Apoptose e necrose de células do tumor de Walker 256 por citometria de fluxo.

Para determinação da taxa de apoptose utilizou-se Anexina V marcada com o fluorocromo fluoresceína (FITC). Anexina tem afinidade pelo fosfolídeos

fosfatidilserina, o qual é externalizado na monocamada interna da membrana celular para a externa durante o início da apoptose. Para determinação da necrose utilizou-se o intercalante de DNA, 7-amino-actinomicin D (7-AAD). Após obtenção, como descrito anteriormente, 10^6 células tumorais de cada grupo foram usadas em duplicata de um total de quatro experimentos. Após separação das células do tecido tumoral, as mesmas foram centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas em tampão fosfato (PBS). O sedimentado foi ressuspenso em tampão de ligação contendo Hepes/NaOH 10mM (pH 7,4), NaCl 140 mM e CaCl_2 2,5mM. Colocou-se então 100 μ L desta solução em tubo de citômetro e adicionou-se 5 μ L de anexina V-FITC. As amostras foram agitadas e incubadas por 5 minutos, onde posteriormente adicionou-se 5 μ L de 7-AAD e incubou-se por mais 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação e as amostras foram lidas em citometria de fluxo utilizando-se o canal FL1 para células marcadas com anexina V e FL3 para as com 7-AAD.

4.9.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).

Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli para deixar as amostras em uma concentração de 3 μ g/ μ L. O tampão de Laemmli constitui-se de SDS para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida; e β -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

4.9.6.1 Quantificação protéica das amostras para eletroforese-Western Blotting

Amostras de 100mg de tumor foram homogeneizadas em tampão de lise na proporção de 1:7 com auxílio de homogeneizador de tecidos, centrifugadas por 5 minutos a 5000G e o sobrenadante coletado para quantificação protéica. A

quantificação de proteína foi mensurada pelo método de Bradford (1976) como descrito acima.

4.9.6.2 Separação eletroforética das proteínas

Ao serem submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram de acordo com vários fatores como, por exemplo, massa molecular, carga, formato e interação com outras moléculas (proteínas e lipídeos). O método "SDS-PAGE" descrito por Laemmli em 1960 foi desenvolvido para que esta migração dependa basicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende parcialmente de suas massas moleculares.

O gel de empilhamento foi preparado a 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Após passarem pelo gel de empilhamento as amostras alcançam o gel de resolução onde as amostras começam a migrar de acordo com o peso molecular das mesmas. A concentração de poliacrilamida do gel de separação foi de 15%.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-PAGE" por cerca de 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas pelo uso de anticorpos (Western Blotting).

4.9.6.3 Western Blotting

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin e colaboradores. Baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono e policlonais, incluindo a detecção, quantidade relativa e o peso molecular das proteínas em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, elas foram transferidas para membrana de nitrocelulose,

onde se procedeu ao método. Esta membrana foi submetida à incubação com tampão de bloqueio, contendo 1,5% de BSA, para bloqueio de ligação inespecífica do anticorpo, durante duas horas. Após este período, a membrana foi incubada em tampão de incubação contendo 1,5% de BSA e o anticorpo primário contra a proteína alvo (Bax, Bcl-2 e PIF). Para visualização da interação proteína-anticorpo foi então utilizado anticorpo secundário contra o anticorpo primário, sendo este complexado com enzima HRP (horseradish peroxidase) ou no caso d PIF utilizou-se anticorpo conjugado com estreptavidina e função peroxidase. Pela adição de substrato quimioluminescente pode-se observar-se em filme Kodak para radiografia as proteínas Bax, Bcl2 e PIF.

4.10 Metodologias dos ensaios utilizando linfócito

4.10.1 Obtenção de Linfócitos

Dos animais sacrificados, os linfonodos mesentéricos foram retirados e dissecados. Os linfócitos foram obtidos através da sua maceração e filtragem. Através deste sistema foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura (VIEIRA *et al.*, 1990). Os linfócitos foram mergulhados em solução salina 0,9% e após a filtragem em papel filtro especial (Whatman nº 105), centrifugados (Eppendorf Centrifuge 5810 R) a 1200-1400 rpm, 4°C, durante seis minutos. Após a centrifugação, os linfócitos foram ressuspensos, filtrados e mergulhados em solução hemolítica por 15 minutos, em banho Maria a 37°C, para remoção das hemácias.

4.10.2 Capacidade proliferativa de linfócitos

Uma vez isolados os linfócitos, 2×10^6 células/mL, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de

antibiótico (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10mg/L), em placas de 96 poços, a 37°C em atmosfera de 95% ar / 0,5% CO₂, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20µL de mitógeno Concanavalina A (ConA), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após 48 horas, foram adicionados 20µL de uma solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 µCi/escavação) e as células foram cultivadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Após este período, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para frascos contendo 1 mL de líquido de cintilação e foram levados para mensuração em contador Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm).

4.11 - Análise estatística

Os dados serão expressos como média ± erro padrão da média (EPM), representativos de pelo menos três experimentos diferentes. A análise estatística será ANOVA de duas vias com o pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS DE CAQUEXIA

5.1.1 Triacilglicerolemia (TAGs)

A presença do tumor (SW) aumentou em 3,6 vezes a concentração de TAGs quando comparado à de seu controle (S) ($p<0,001$). A suplementação com glutamina nos animais sedentários com tumor (SWG) não impediu a elevação pronunciada de TAGs, com aumento de 4,2 vezes com relação ao seu controle (SG) ($p<0,001$). Com a prática de atividade física no grupo portador de tumor (EW), a concentração de TAGs aumentou 1,8 vezes com relação ao seu controle (E) porém 1,9 vezes menor comparada a SW ($p<0,01$). Na presença do tumor, a suplementação associada à atividade física (EWG) houve aumento das concentrações de TAGs em 1,8 vezes com relação ao seu controle (EG) ($p<0,05$), porém menor quando comparada ao grupo SW ($p<0,05$) e SWG ($p<0,01$).

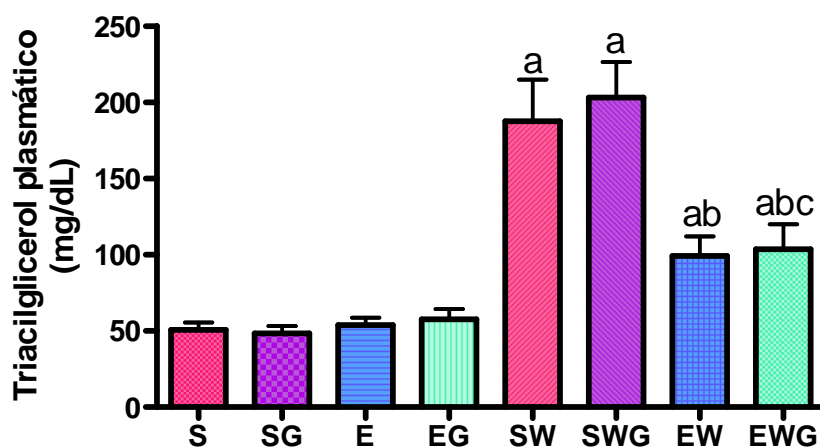


FIGURA 11 – Concentração de triacilglicerol sérico (mg/dL) dos grupos Sedentário (S) , Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). O dados

estão apresentados como média \pm EPM de 24 (S), 20 (SG), 18 (E), 17 (EG), 8 (SW), 7 (SWG), 11 (EW), 10 (EWG) indivíduos por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado a seus respectivos controles. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SW. ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SWG

5.1.2 Concentração plasmática de glutamina

Na presença do tumor, a concentração plasmática de glutamina dos ratos sedentários (SW) foi 1,2 vezes menor quando comparada à do grupo S ($p < 0,01$) e à do grupo SWG ($p < 0,05$). No grupo exercitado (EW) foi 1,5 vezes menor do que à do controle (E) ($p < 0,05$). Os grupos com ausência do tumor e SWG e EWG não tiveram diferença significativa entre si.

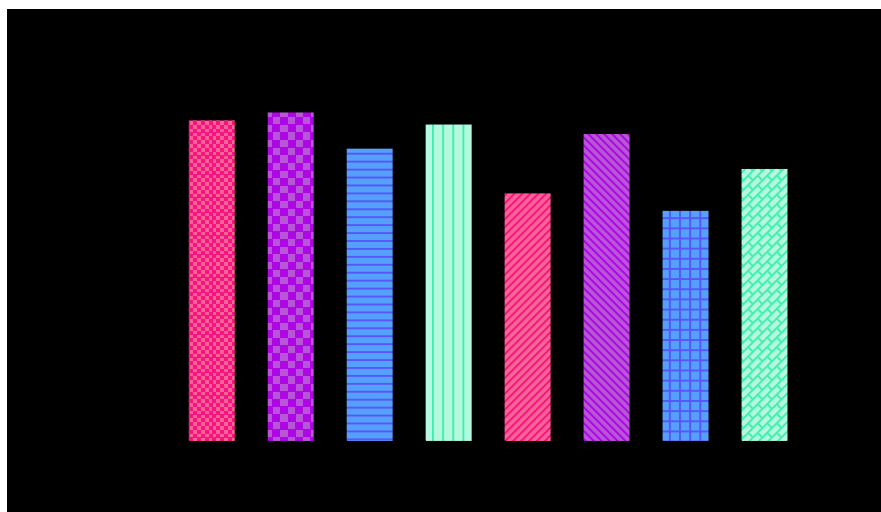


FIGURA 12 – Concentração de glutamina plasmática (mmol/L) dos grupos Sedentário (S) , Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 14 (S, SW), 11 (SG, EG), 13 (E, EWG), 12 (SWG, EW) indivíduos por grupo. ^a $p < 0,01$ com relação a seus respectivos controles. ^b $p < 0,05$ comparado a SW.

5.1.3 Glicogênio Hepático

O glicogênio hepático ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) dos grupos SWG, EW e EWG manteve-se na faixa de 30, inferior à de seus respectivos controles SG ($p<0,01$), E ($p<0,05$) e EG (0,001). O grupo SW apresentou conteúdo diminuído para $23,6 \mu\text{mol/g}$ de tecido, comparado ao seu controle S ($p<0,001$), SWG ($p<0,01$), EW ($p<0,001$) e EWG ($p<0,001$). Sem a presença do tumor a concentração hepática de glicogênio não apresentou diferença significativa.

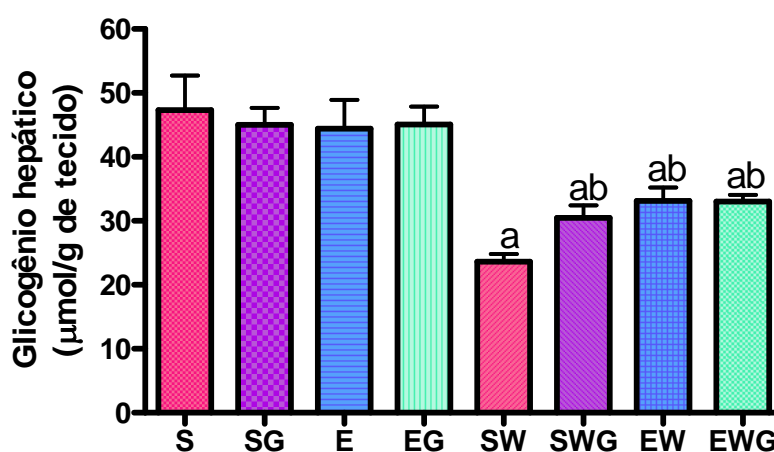


FIGURA 13 - Concentração hepática de glicogênio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 (S), 11 (SG, SW e SWG), 9 (E), 12 (EG), 13 (EW) e 14 (EWG) indivíduos por grupo. ^a $p<0,05$ quando comparado a seus respectivos controles. ^b $p<0,05$ quando comparado a SW.

5.1.4 Lactatemia

Os animais sem tumor (S, SG, E e EG) apresentaram lactatemia aproximadamente igual a 1,4 mmol/L. A presença do tumor nos animais do grupo SW aumentou em 2,3 vezes a concentração de lactato quando comparado à de seu controle S ($p<0,001$), no grupo SWG foi de 2,2 vezes maior do que à do grupo SG ($p<0,001$) e nos grupos EW e EWG foi de 1,5 superior à de seus respectivos controles E e EG ($p<0,05$). A presença da atividade física no grupo com tumor (EW) foi capaz de diminuir em 1,5 vezes a concentração plasmática de lactato quando comparado à do SW ($p<0,05$)

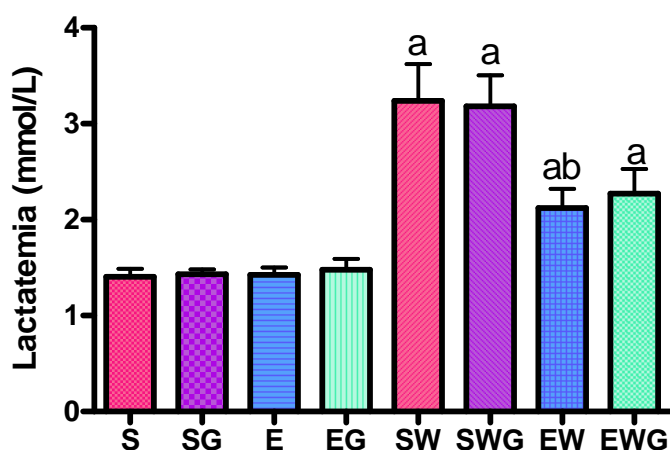


FIGURA 14 – Lactatemia (mmol/L) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). O dados estão apresentados como média \pm EPM de 6 (S, E, EG, SW, EWG), 7 (SG, SWG) e 8 (EW). ^a $p<0,05$ quando comparado a seus respectivos controles. ^b $p<0,05$ quando comparado a SW.

5.1.5 Glicemia

A presença do tumor de Walker 256 induziu a redução significativa da glicemia plasmática dos grupos SW, SWG e EW quando comparado à do S, SG e E respectivamente. ($p < 0,05$). O grupo EWG não apresentou diferença significativa com relação ao seu grupo controle.

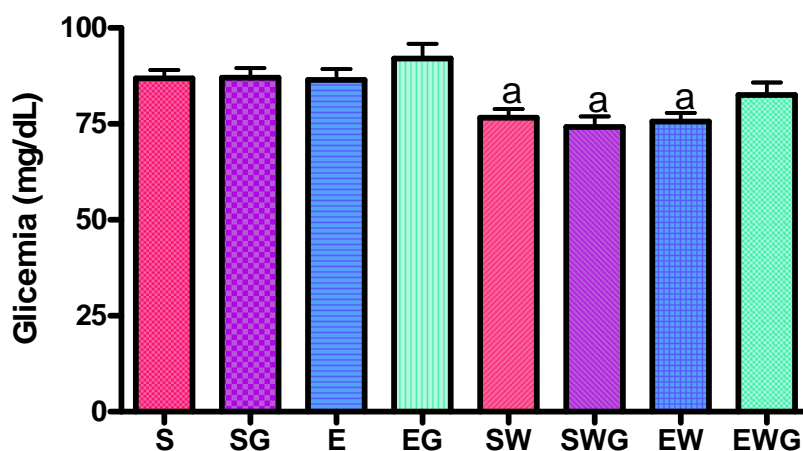


FIGURA 15 – Glicemia (mg/dL) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). O dados estão apresentados como média \pm EPM de 12 (S, SW), 13 (SG), 11 (E), 10 (EG, SWG) e 8 (EW e EWG). ^a $p < 0,05$ quando comparado a seus respectivos controles.

TABELA 2 – Resumo dos dados de parâmetro de caquexia

	TAGs (Mg/dL)	Glutamina mmol/L	Glicogênio (μmol/g)	Lactato (mmol/L)	Glicemia (mg/dL)
S	50,75 ± 4,71	0,599 ± 0,03	39,94 ± 3,62	1,406 ± 0,08	76,58 ± 2,27
SG	48,35 ± 4,97	0,607 ± 0,04	40,10 ± 1,99	1,433 ± 0,05	74,2 ± 2,27
E	53,78 ± 4,9	0,548 ± 0,02	41,12 ± 3,44	1,426 ± 0,08	75,67 ± 2,17
EG	57,65 ± 6,69	0,570 ± 0,02	45,06 ± 2,83	1,478 ± 0,11	82,5 ± 3,29
SW	187,5 ± 27,39 ^a	0,465 ± 0,02 ^a	23,63 ± 1,21 ^a	3,237 ± 0,39 ^a	86,9 ± 2,15 ^a
SWG	203 ± 23,28 ^a	0,530 ± 0,02 ^b	29,13 ± 1,60 ^{ab}	3,183 ± 0,32 ^a	87,08 ± 2,42 ^a
EW	99,18 ± 12,76 ^{ab}	0,434 ± 0,03 ^a	33,13 ± 2,07 ^{ab}	2,123 ± 0,20 ^{ab}	86,45 ± 2,85 ^a
EWG	103,5 ± 16,55 ^{abc}	0,511 ± 0,03	39,94 ± 3,62 ^{ab}	2,271 ± 0,26 ^a	92 ± 3,89

^ap<0,05 quando comparado a seus respectivos controles.

^bp<0,05 quando comparado ao grupo SW.

^cp<0,05 quando comparado ao grupo SWG

5.2 Peso do baço

Nos animais sem tumor submetidos ou não à atividade física ou à suplementação com glutamina, não apresentaram alterações do peso do baço. Por outro lado a presença do tumor provocou aumento de 2,2 no peso do baço dos animais SW e SWG, 2 vezes no EW e 1,9 no EWG quando comparado ao de seus respectivos controles. Interessantemente o peso do baço no SW foi de aproximadamente 1,2 vezes maior do que EW ($p < 0,05$) e EWG ($p < 0,05$).

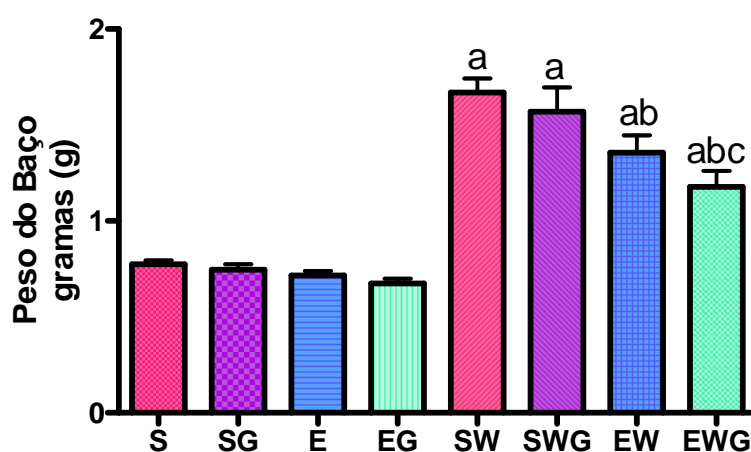


FIGURA 16 – Peso do baço (gramas) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). O dados estão apresentados como média \pm EPM de 26 (S), 20 (SG), 18 (E, SW), 16 (EG), 15 (SWG), 17 (EW), 14 (EWG). ^a $p < 0,001$ quando comparado a seus respectivos controles. ^b $p < 0,05$ quando comparado a SW. ^c $p < 0,05$ quando comparado a SWG.

5.3 Parâmetros relacionados ao tumor de Walker 256

5.3.1 Peso do tumor

A massa tumoral teve maior desenvolvimento após 15 dias de inoculação. No grupo SW e SWG o peso, ao final de 15 dias, foi de 25,1 e 22,7 gramas respectivamente, sem diferença significativa entre os dois grupos. Nos demais grupos (EW e EWG) o peso do tumor foi 1,5 menor em relação aos seus controles (SW e SWG) ($p < 0,001$).

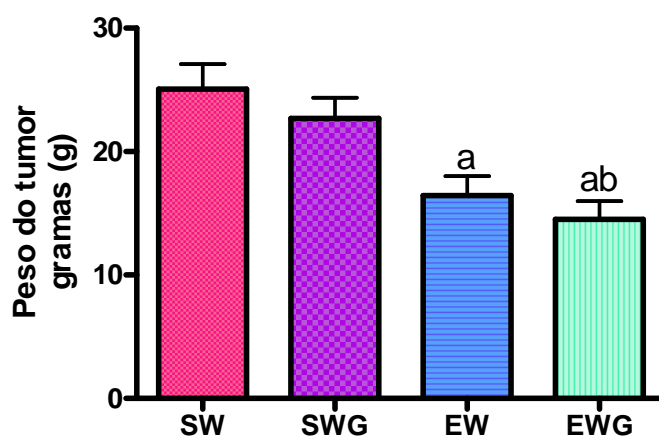


FIGURA 17 – Peso do tumor (g) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 13 (SW, SWG, EWG) e 12 (EW). ^a $p < 0,01$ em comparação a seus controles. ^b $p < 0,001$ em comparação a SW.

5.3.2 Peso corpóreo após implantação do tumor

TABELA 3 – Peso dos indivíduos antes e 15 dias após inoculação do tumor, peso dos tumores ao final de 15 dias e ganho de peso no mesmo período.

	Peso no dia da inoculação do tumor	Peso 15 dias após a inoculação do tumor	Ganho de peso 15 dias após inoculação	Peso do tumor	Peso da carcaça	Variação do peso
S	369,7 ± 11,3	381,4 ± 11,3	11,73 ± 1,7	-	381,4 ± 11,3	11,73 ± 1,7
SG	365,2 ± 6,1	373,3 ± 6,2	8,13 ± 1,3	-	373,3 ± 6,2	8,13 ± 1,3
E	331 ± 7,9	339,1 ± 7,3	8,08 ± 1,3	-	339,1 ± 7,3	8,08 ± 1,3
EG	309,6 ± 5,4	318,9 ± 5,1	9,75 ± 3,7	-	318,9 ± 5,1	9,75 ± 3,7
SW	378,2 ± 13,3	393 ± 15,24	14,8 ± 2,8	25,07 ± 2	358,2 ± 15,9	-8,6 ± ^a 4,1
SWG	361,8 ± 21,9	380,8 ± 22,6	19 ± 3	22,68 ± 1,7	348,1 ± 26,2	-3,74 ± ^a 3,4
EW	334,5 ± 5,4	350,7 ± 7	14,7 ± 2,6	16,45 ± ^a 1,6	328,9 ± 7,6	-1,52 ± 3,9
EWG	333,7 ± 8,6	348,8 ± 6,9	15,2 ± 3,1	14,52 ± ^a 1,5	332,3 ± 8,2	1,76 ± 2,9

^ap<0,05 quando comparado a seus respectivos controles.

5.3.3 Proliferação de células tumorais “ex vivo”

Na figura 18 estão apresentados os dados sobre a proliferação das células tumorais cultivadas “ex vivo” durante 24 horas em contagem por minuto. A proliferação foi maior nos ratos sedentários quando comparada aos ratos exercitados, sendo SW 1,3 vezes maior do que EW e EWG, e SWG 1,3 maior quando comparada a EWG.

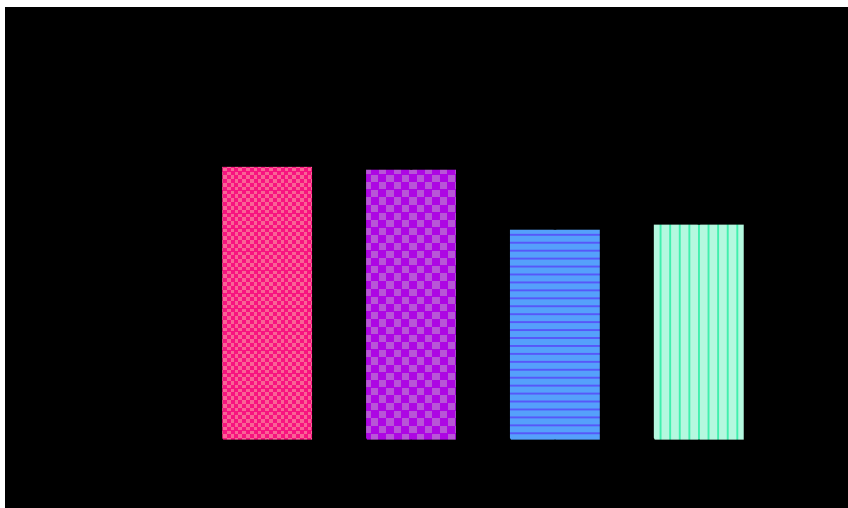


FIGURA 18 – Proliferação de célula tumoral em contagem por minuto dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). ^a $p < 0,001$ em comparação a seus controles. ^b $p < 0,001$ em comparação a SW.

5.3.4 Produção de lipoperóxidos

Na figura 19 estão apresentados os dados de produção de lipoperóxidos (nmol/mg de proteína). A presença de lipoperóxidos nos grupos EW (0,1479 nmol/mg proteína) e EWG (0,1373 nmol/mg proteína) estava aumentada em relação à SW (0,037 nmol/mg proteína) e SWG (0,052 nmol/mg proteína) ($p < 0,001$). A presença da suplementação não foi capaz de aumentar a produção de lipoperóxido.

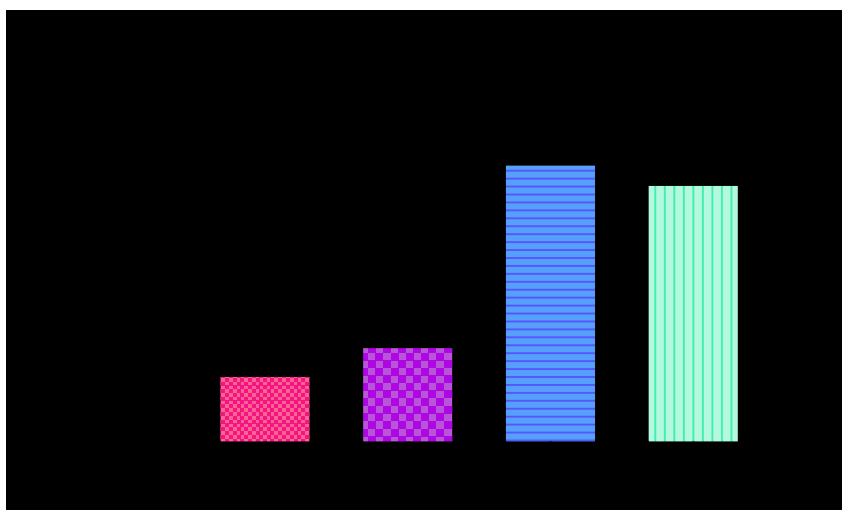


FIGURA 19 – Produção de lipoperóxidos (nmol/mg proteína) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 20 (SW), 14 (SWG), 11 (EW) e 13 (EWG). ^a $p < 0,001$ em comparação a seus controles. ^b $p < 0,001$ em comparação a SW.

5.3.5 Western blotting de proteínas do tumor de Walker 256

5.3.5.1 PIF

Os dados da figura 20 representam a expressão de PIF em tecido tumoral (unidades arbitrárias). A suplementação com glutamina não induziu a alterações significativas na expressão de PIF. Por outro lado, a atividade física foi hábil em promover redução de 12% da expressão de PIF no grupo EW comparada a SW ($p<0,01$). O grupo EWG apresentou redução de 11% na expressão quando comparada a seu controle SWG e a SW ($p<0,01$).

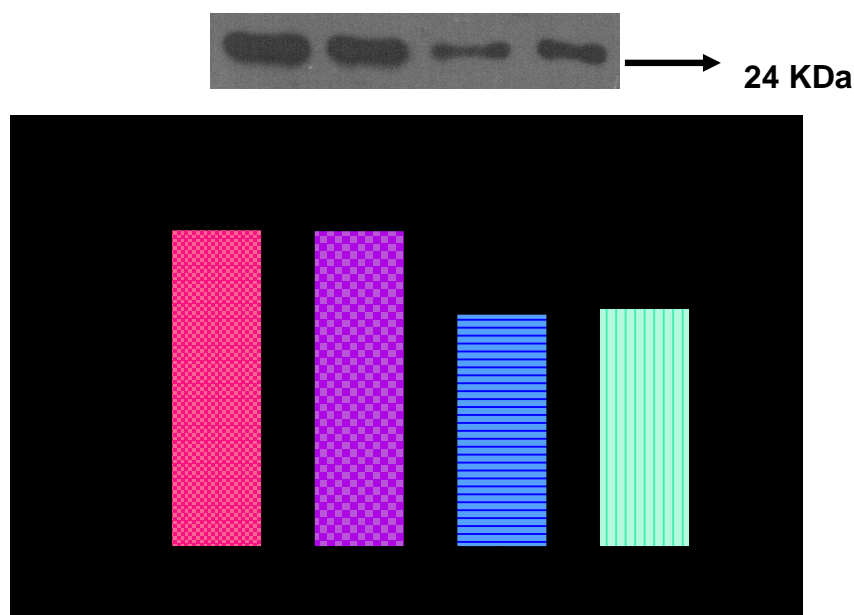


FIGURA 20 – Expressão de PIF em tecido tumoral (unidades arbitrárias) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de unidades arbitrárias. ^a $p<0,01$ em comparação a seus controles. ^b $p<0,01$ em comparação a SW.

5.3.4.2 Bax

A expressão de Bax no tecido tumoral esta apresentado na figura 21 (unidades arbitrárias). Os ratos do grupo EW e EWG tiveram aumento da expressão de Bax quando comparado à de seu controle SW ($p<0,001$) e SWG ($p<0,05$) respectivamente. A suplementação não induziu ao aumento da expressão dessa proteína.

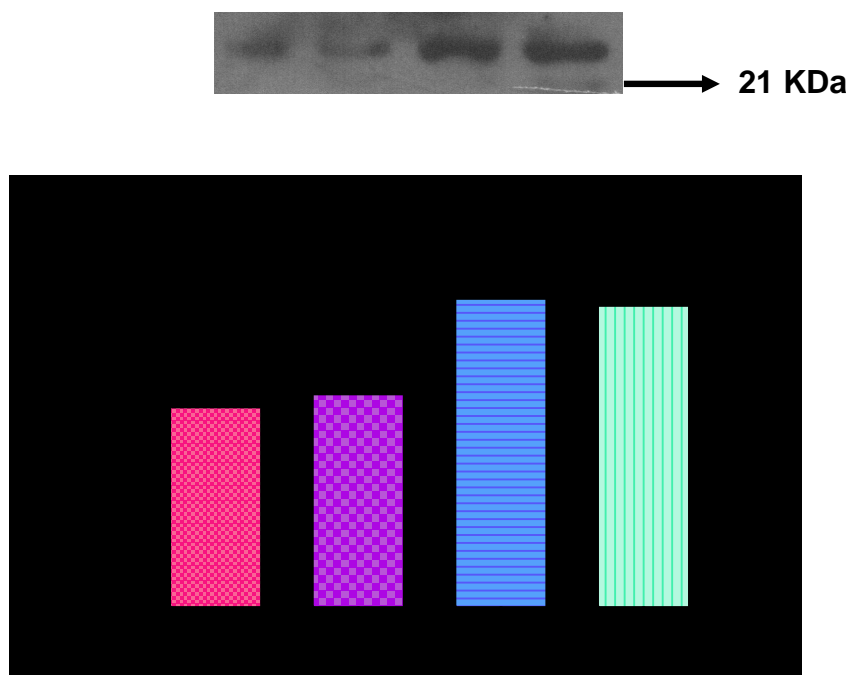


FIGURA 21 – Expressão de bax em tecido tumoral (unidades arbitrárias) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de unidades arbitrárias. ^a $p<0,05$ em comparação a seus controles. ^b $p<0,01$ em comparação a SW.

5.3.5.3 Bcl-2

A figura 22 representa expressão de Bcl-2 em tecido tumoral (unidades arbitrárias). A expressão de Bcl-2 nos ratos do grupo EW e EWG estava diminuída quando comparado à de seu controle SW ($p<0,05$) e SWG ($p<0,05$) respectivamente.

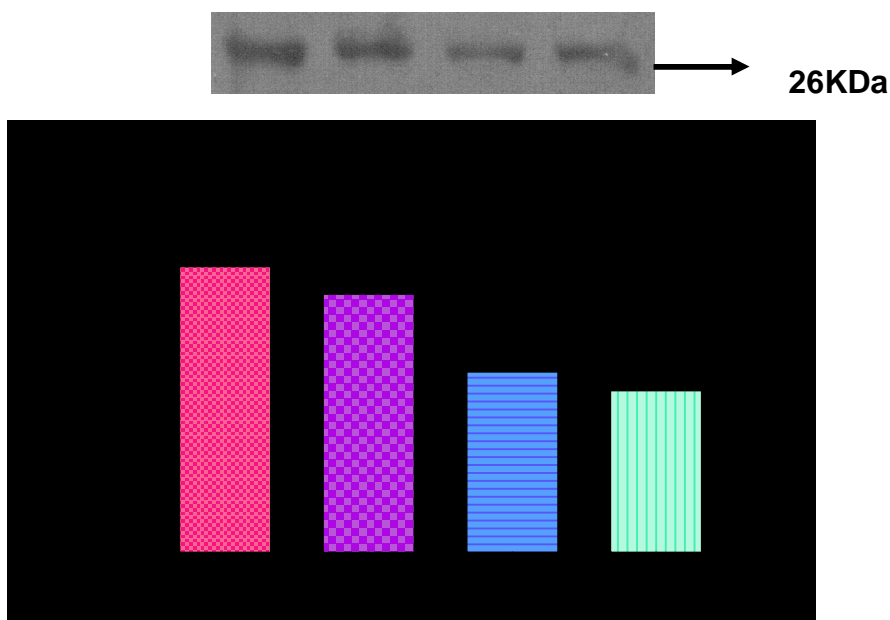


FIGURA 22 – Expressão de bcl-2 em tecido tumoral (unidades arbitrárias) dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de unidades arbitrárias. ^a $p<0,05$ em comparação a seus controles. ^b $p<0,01$ em comparação a SW.

5.3.6 Apoptose das células do tumor de Walker 256

Na figura 23 estão representados os resultados referente ao percentual de células em apoptose, marcadas com anexina, células em necrose, marcadas com 7-AAD, células com dupla marcação e células viáveis de tumor de Walker 256 dos grupos SW, SWG, EW e EWG. Na figura 24 representa o gráfico referente ao percentual de células em apoptose, mostrando que a suplementação com glutamina e o exercício de salto provocaram aumento do número de células em apoptose, porém sem efeito somatório da suplementação e do exercício. Na figura 25 representa o gráfico referente ao percentual de células em necrose

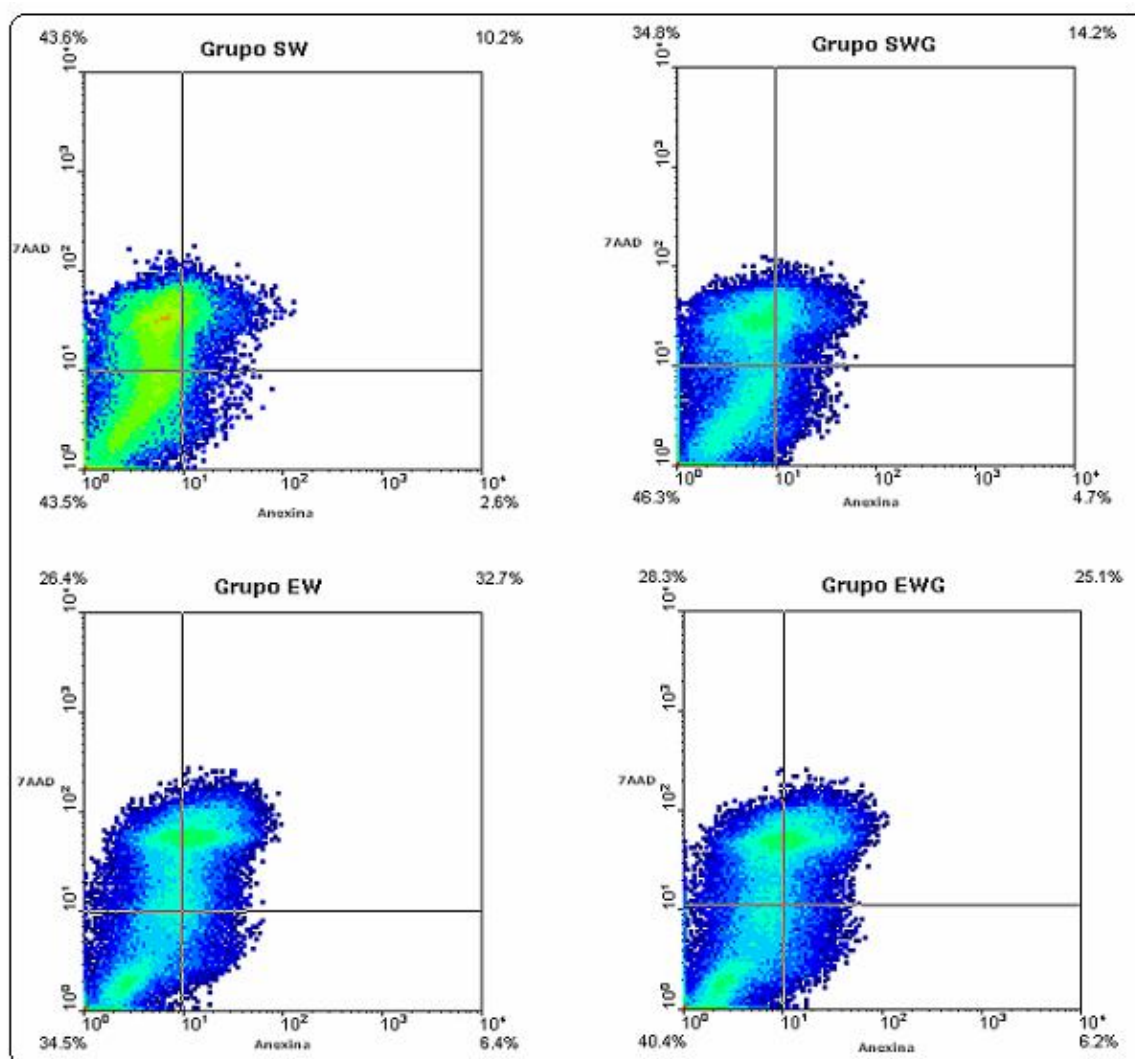


FIGURA 23 – Percentual de células em apoptose, mostrada no quadrante inferior direito, de necrose, no quadrante superior esquerdo, duplo marcada, no quadrante superior direito e células viáveis apresentada no quadrante inferior esquerdo dos grupos SW, SWG, EW e EWG.

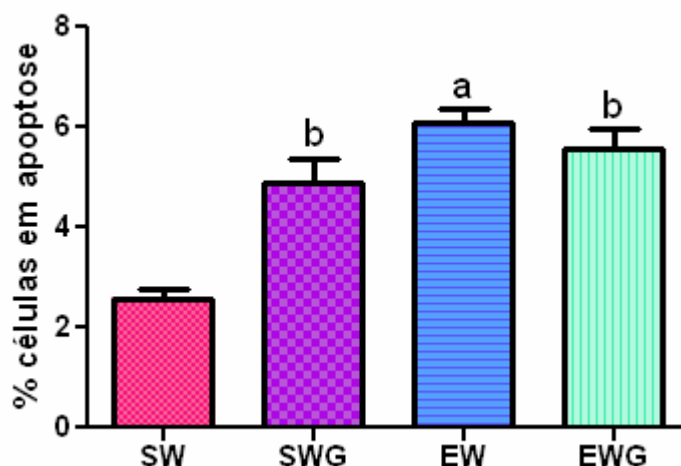


FIGURA 24 – Apoptose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256 dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos. ^a $p < 0,001$ em comparação a seu controle. ^b $p < 0,01$ em comparação a SW.

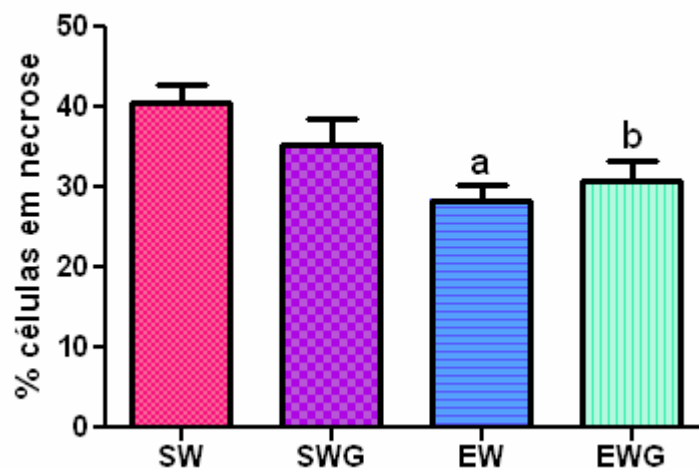


FIGURA 25 – Necrose (%) de células obtidas do tumor de Walker 256 dos animais dos grupos Sedentário portador de tumor (SW), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos. ^a $p < 0,01$ em comparação a seu controle. ^b $p < 0,05$ em comparação a SW.

5.4 Parâmetro imunitário

5.4.1 - Proliferação de Linfócitos T

A figura 26 representa a proliferação de linfócitos T obtidos do linfonodo mesentérico, em contagem por minuto (cpm), na ausência (barra vermelha) e na presença de mitógeno (barra azul). A presença do tumor foi capaz de estimular ainda mais essa proliferação. Os linfócitos dos animais SW estimulados com mitógeno tiveram aumento em 1,6 vezes quando comparado à de seu controle S ($p<0,05$) e na ausência do mitógeno esse aumento foi de 3,8 vezes ($p<0,001$). A suplementação com glutamina (SWG) com estímulo, observou-se aumento significativo com relação a seu controle SG ($p<0,001$) e com relação a SW ($p<0,05$). Sem o estímulo esse aumento foi de 2,2 vezes ($p<0,05$) comparadas ao de seu controle (SG). Com a prática do exercício de salto (EW) na presença do mitógeno, a proliferação foi maior comparada à de seu controle E ($p<0,001$) e comparada à do SW ($p<0,001$). Na ausência do mitógeno, esse aumento foi de 2,9 vezes ($p<0,05$). Ratos exercitados e suplementados com glutamina (EWG), a proliferação, quando comparada à de seu controle EG foi 4,2 vezes superior ($p<0,001$), 2,9 vezes maior comparada à do SW ($p<0,001$), 1,7 comparada à do SWG ($p<0,01$) e 1,3 comparado à do EW ($p<0,05$). Na ausência do mitógeno a proliferação foi 2,1 vezes maior comparado à de seu controle ($p<0,05$).

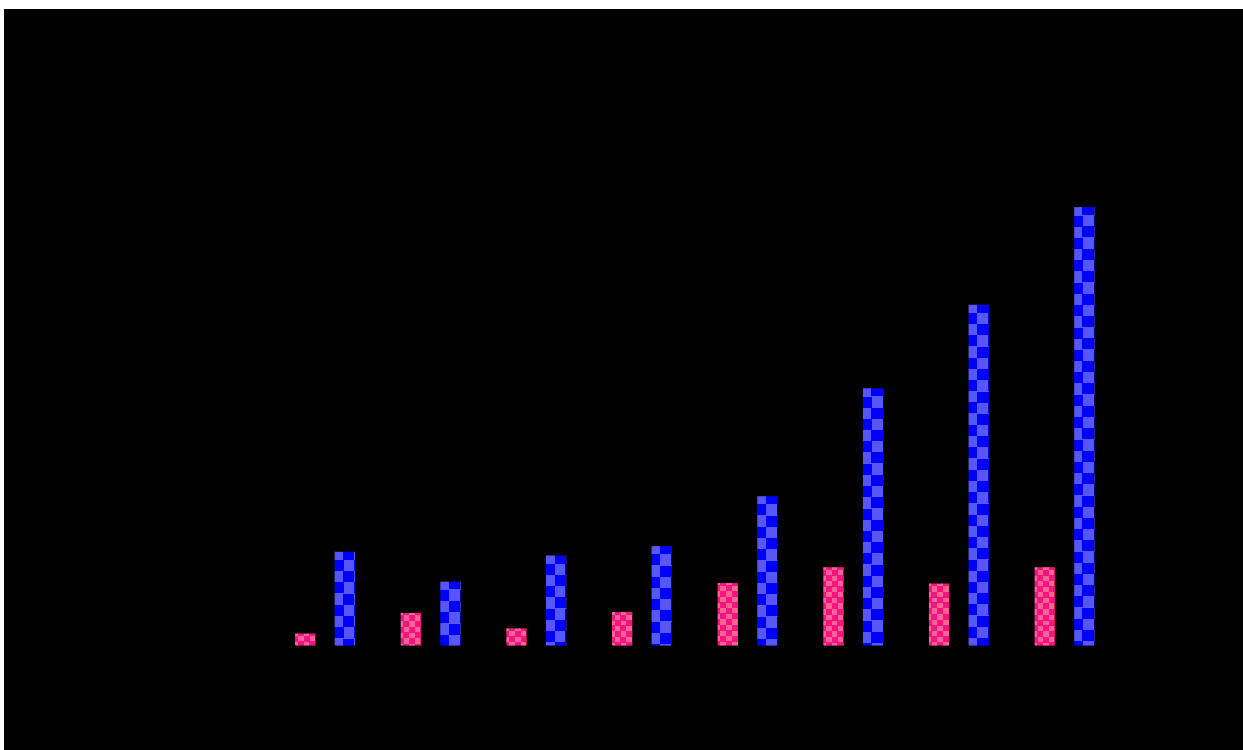


FIGURA 26 – Proliferação de linfócitos estimulados com con-A (barra azul) e sem con-A (barra vermelha) (contagem por minuto) dos grupos Sedentário (S), Sedentário suplementado com glutamina (SG), Exercitado (E), Exercitado suplementado com glutamina (EG), Sedentário portador de tumor (W), Sedentário portador de tumor suplementado com glutamina (SWG), Exercitado portador de tumor (EW) e Exercitado portador de tumor suplementado com glutamina (EWG). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 19 (S), 18 (SG, EW), 16 (E, EG), 23 (SW), 17 (SWG, EWG). ^a $p < 0,05$ quando comparado a seus respectivos controles. ^b $p < 0,05$ quando comparado a SW. ^c $p < 0,05$ quando comparado a SWG e EW. ^d $p < 0,05$ quando comparado a S na ausência de mitógeno.

6 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que leva a intenso estado catabólico apresentando alterações no metabolismo de proteína, carboidrato e lipídeos, acompanhada de alterações neuroendócrinas, consequência do desenvolvimento da síndrome da caquexia (Mac DONALD et.al., 2003). Os mecanismos pelos quais a caquexia leva ao aumento da morbi-mortalidade podem ser devido à desnutrição, perda de massa muscular e aumento da intolerância a drogas mais potentes (EMERY, 1999). A atividade física pode auxiliar no tratamento, melhorando a saúde física e mental, diminuindo os efeitos colaterais e o nível de toxicidade das drogas utilizadas durante o tratamento, prevenindo a perda de peso e o ganho de gordura, melhorando o estado de humor, a qualidade de vida e potencializando a eficácia do tratamento (COURNEYA; FRIEDENREICH, 2007). Ainda, pode atuar melhorando a função imunitária, aumentando a síntese protéica e atividade das enzimas antioxidantes (ARDIES, 2002).

A atividade física regular vem sendo utilizada como prevenção ou tratamento terapêutico em diversas situações patológicas. Sabe-se que a prática regular de atividade física está associada à redução do risco de desenvolvimento do câncer de colo, mama, endométrio, próstata e pulmão (COURNEYA; FRIEDENREICH, 2007) e quando na presença do tumor, diminui os níveis de fadiga em pacientes com câncer de mama e cabeça (AGHILI; RADE, 2007). Stevinson et.al. (2007) relataram forte associação entre qualidade de vida e a prática de atividade física em pacientes com câncer de ovário. Em nosso trabalho, ratos submetidos a protocolo de exercício de salto durante oito semanas, tiveram atenuação de alguns parâmetros no quadro metabólico causado pela síndrome da caquexia. Bacurau et.al. (2007) demonstraram que ratos portadores de tumor de Walker 256, que praticavam exercício de alta intensidade (85% do VO₂ máximo), tiveram alguns sintomas de caquexia atenuados, tais como a expressiva perda de peso e redução da ingestão alimentar. Alteração metabólica envolvendo mudanças neuroendócrinas como a produção excessiva de citocinas, é provavelmente a causa mais comum do desenvolvimento da caquexia e o

exercício pode regular, positivamente, essas alterações (COSTA ROSA, 2004). O aumento da concentração de algumas citocinas consideradas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, parece apresentar um estímulo repressor potencial da caquexia (SKIPWORTH, et.al.; 2007). O exercício físico, em uma intensidade moderada, tem a característica de promover aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, podendo então, ter efeito direto na intensidade do quadro de caquexia (PETERSEN; PETERSEN, 2005). Em nosso estudo não analisamos concentrações de citocinas, porém o efeito atenuado em alguns desses parâmetros, em ratos exercitados, pode ser devido a alterações do perfil de citocinas no organismo.

Parâmetros de caquexia avaliados neste trabalho como glicemia, lactatemia, concentração de triacilglicerol, glutamina, conteúdo de glicogênio hepático (TABELA 2) e ganho de peso corporal (TABELA 3), estavam alterados na presença do tumor. A perda de peso foi significativamente maior nos indivíduos sedentários (SW e SWG) quando comparados aos exercitados (EW e EWG), porém todos os indivíduos portadores de tumor apresentaram perda de peso (SW, SWG e EW) ou pouco ganho de peso (EWG). A perda de peso é maior em pacientes com câncer, pois o tumor possui alto consumo de energia e gera uma ineficiência energética, responsável pela maior utilização da glicose, diminuição do glicogênio intramuscular e hepático (SKIPWORTH, et.al.; 2007), aumento da produção de lactato e da gliconeogênese, responsável por afetar a disponibilidade de aminoácidos para síntese protéica (EMERY, 1999; BONGAERTS, et.al.; 2006). Ainda, a excessiva perda de peso ocasionada durante a caquexia, está relacionada com a atrofia muscular que é, em parte, resultado da inadequada atividade anabólica neuro-hormonal e/ou excesso da atividade catabólica. O exercício físico, numa intensidade e duração adequada é capaz de estimular alguns mediadores anabólicos, como testosterona e hormônio do crescimento e inibir mediadores catabólicos, como o cortisol, melhorando o estado de pacientes caquéticos, com relação a sua constituição corporal. A contração muscular ativa a cascata de sinalização intramuscular específica que aumenta a massa muscular, a concentração de proteínas do citoesqueleto e a força de contração (BAAR; ESSER, 1999).

A prática de exercício foi capaz de modificar outros parâmetros avaliados e a explicação para estes resultados pode provir do menor crescimento tumoral, pois o tumor de Walker 256 é ávido consumidor de glicose e produtor de lactato. Observou-se redução significativa da concentração de lactato nos ratos exercitados (FIGURA 14). O exercício promove melhora na eficiência metabólica devido a mudanças na característica das fibras musculares esqueléticas e conseqüentemente menor produção de lactato, diminuindo a fadiga (LUCÍA et.al.; 2003). Já a hipoglicemia, conseqüência do maior consumo de glicose pelo tumor, foi observada nos ratos SW, SWG e EW; no grupo onde a suplementação esteve associada a prática de atividade física a glicemia se manteve normal, porém sem diferença significativa entre os outros grupos com tumor (FIGURA 15).

O protocolo de exercício de salto utilizado neste trabalho é caracterizado como exercício resistido. Este tipo de atividade possui a propriedade de estimular o crescimento, vascularização e metabolismo, gerando adaptações e mudanças metabólicas importantes, relacionadas ao sistema energético e muscular (ZAMBON, et.al.; 2003). Neste trabalho, encontrou-se diminuição do conteúdo de glicogênio hepático nos ratos portadores de tumor, conseqüência da alta atividade glicolítica presente nas células tumorais; contudo, ratos que sofreram algum tipo de tratamento (SWG, EW e EWG), tiveram aumento da concentração de glicogênio quando comparada ao grupo SW (FIGURA 13). Quist et.al. (2006) relataram que exercício de força exerce efeitos positivos em pacientes com câncer, melhorando sua capacidade física e diminuindo a fadiga. Este quadro pode estar relacionado à menor utilização de glicose pelo tumor, menor concentração de lactato plasmático e conseqüentemente conservação das reservas de glicogênio muscular e hepático.

A caquexia altera o metabolismo de lipídeos, aumentando a sua mobilização, diminuindo a lipogênese e a atividade da LPL, enzima responsável por diminuir as concentrações de triacilglicerol do plasma (INUI, 2002; TISDALE, 2000). Tisdale (2000) sugere que o aumento de citocinas na circulação, recorrente da presença do tumor, inibe a LPL, que é responsável por reduzir extração de lipídeos do plasma para estoque no tecido adiposo e aumentar a concentração de lipídeos sanguíneos.

Hipertriacilglicerolemia foi encontrada nos ratos portadores de tumor porém, ratos exercitados (EW e EWG) apresentaram diminuição significativa da concentração plasmática de triacilglicerol (FIGURA 11). Durante exercício, de intensidade moderada, ocorre diminuição da mobilização de lipídeo do tecido adiposo para corrente sanguínea e aumento da oxidação de triacilglicerol do plasma e intramuscular (SILVA, et.al.; 2004). Ainda, o aumento da liberação de catecolaminas durante o exercício leva ao aumento da oxidação de ácidos graxos (BORSHEIM, BAHR; 2003), efeito este que pode estar contribuindo para diminuição da concentração de triacilglicerol nos ratos exercitados com tumor (EW e EWG).

A suplementação com glutamina (0,125g/Kg de peso corporal) não apresentou alteração direta sobre parâmetros de caquexia, porém possui função imunomoduladora, onde a, diminuição da sua concentração plasmática pode comprometer atividade do sistema imunitário (JING-XIANG, et.al.; 2004), promover diminuição no conteúdo de glicogênio muscular e hepático e alteração do metabolismo de aminoácidos do músculo esquelético (CASTELL, 2003). Ainda, a glutamina é considerada um substrato anabólico para as células, pois regula a síntese protéica e de bases nitrogenadas podendo ter um efeito positivo em pacientes que apresentam a síndrome da caquexia (FUCHS, BODE; 2006). Em nosso estudo, observamos que a suplementação com glutamina (SWG e EWG), no período onde o tumor encontrava-se instalado, foi capaz de manter a concentração de glutamina plasmática normal comparada aos grupos sem tumor, o que não foi visto nos grupos onde não houve a suplementação (EW e SW) (FIGURA 12). Hiscock et.al. (2003) suplementaram alguns atletas com glutamina após duas horas no ciclo ergômetro a 75% do VO₂max e observaram que a suplementação foi capaz de manter a concentração normal de glutamina plasmática e esteve associada com aumento da concentração de IL-6, citocina que pode ter função de estimular a síntese de outras citocinas com perfil anti-inflamatório. O uso de 0,3g/Kg/dia de glutamina em dieta parenteral tem mostrado ser capaz de reverter o quadro de caquexia e melhorar o balanço nitrogenado (JING-XIANG, et.al.; 2004). Ainda, sua combinação com arginina e β-hidroxi β-metilbutirato (HMB) , um metabólito da leucina, em pacientes com severa perda de peso, foi

mostrado aumentar a síntese e reduzir a degradação protéica. O mecanismo de ação ainda é desconhecido, porém presume-se que a glutamina está envolvida na síntese protéica (MAY et.al.; 2002).

O aparecimento e a severidade da síndrome da caquexia estão relacionados com o tipo e tamanho do tumor. O tumor de Walker é considerado um modelo de câncer que leva à características similares da caquexia em humanos (EMERY, 1999). Após 15 dias de inoculação, a massa tumoral é grande o suficiente para observar alterações metabólicas ocasionadas pela síndrome. Em nosso trabalho, o tamanho do tumor provavelmente foi responsável pelas alterações metabólicas envolvidas no desenvolvimento da síndrome da caquexia, pois observamos que ratos com tumores menores (EW e EWG) tiveram esses parâmetros melhorados, comparados àqueles ratos onde os tumores estavam maiores (SW e SWG). Ratos submetidos a protocolo de exercício de salto, durante oito semanas, tiveram redução significativa da taxa de crescimento tumoral (FIGURA 17). Outros estudos relataram efeitos benéficos do exercício sobre o tumor, como retardo do crescimento tumoral após 30 minutos de natação, cinco dias por semana, durante oito semanas (WESTERLIND, et.al.; 2003). Bacurau, et.al. (2007) mostraram que exercício de alta intensidade, 85% do VO₂max por 30 minutos, cinco vezes por semana, reduz em 10% a massa tumoral. Trabalhos em nosso laboratório relataram diminuição do crescimento tumoral utilizando o mesmo protocolo de exercício (NUNES, 2005; MINUZZI, 2006; KUCZERA, 2007; PESSINI, 2007).

A glutamina não exerceu efeito sobre o crescimento do tumor. Alguns estudos relatam que o uso de glutamina em pacientes com câncer pode acelerar o crescimento tumoral, por isso a sua suplementação ainda é controversa. A hipótese seria de que a suplementação estaria alimentando o tumor e possibilitando o seu desenvolvimento, contudo não há evidência experimental de que isso realmente aconteça (MAY, et.al.; 2002). De fato, a explicação do grau de caquexia estar relacionado ao tamanho do tumor é muito simplista, pois há tumores onde isto não é verdadeiro. Em relação ao tumor de Walker 256, Pizato et.al. (2005) mostraram que ratos portadores do tumor de Walker 256 suplementados com razão 6:1 de ácido graxo ômega-6:ômega-3 tinham a

mesma massa tumoral do grupo não suplementado porém diferente quanto aos parâmetros de caquexia. Isto mostra que o tumor de Walker 256 é um bom modelo para estudo de caquexia e este não está sempre diretamente relacionado ao tamanho do tumor.

Se o tumor possui menor taxa de crescimento nos animais exercitados, aventamos a hipótese de que talvez haja, no ambiente “exercício”, sinais que seriam “captados” pelo tumor reduzindo consequentemente o seu crescimento. Avaliarmos a capacidade proliferativa dessas células tumorais em cultivo *ex vivo*. O resultado mostrou que os grupos exercitados apresentaram taxa de proliferação celular significativamente menor quando comparada à dos grupos sedentários, porém sem efeito supressor ou estimulador da suplementação com glutamina sobre a proliferação (FIGURA 18). O exercício físico promove mudanças importantes que auxiliam na redução da proliferação de células tumorais, pois parece comprometer seu metabolismo de glicose e glutamina (BACURAU, et.al.; 2007), reduzir a concentração de insulina, estradiol, testosterona livre, IGF-1 e aumentar a concentração de proteína ligadora de IGF-1 (IGFBP-1), responsável pela inibição da atividade de IGF-1 (NGO, et.al.; 2003). O aumento da concentração de IGF-1 na circulação está associada com aumento da capacidade proliferativa de células tumorais e diminuição da taxa de apoptose (YU, ROHAN, 2000). Leung, et.al. (2003) mostraram que indivíduos portadores de tumor de próstata, praticante de atividade física, apresentavam diminuição da concentração de IGF-1 e insulina, aumento de IGFBP-1 e em paralelo, diminuição do crescimento tumoral, aumento da apoptose e da proteína p53; proteína anti-oncogênica responsável por proteger o genoma da célula de mutações e alterações genéticas.

Outros mecanismos relacionados ao exercício físico são responsáveis por alterar o desenvolvimento tumoral. Célula tumoral, por ser um tipo de célula que possui quantidade de mitocôndria reduzida, produz uma quantidade menor de espécies reativas de oxigênio e defeito na sua defesa antioxidante (LU, 2007). O estresse oxidativo possui importante papel na indução da apoptose e por isso a peroxidação lipídica é importante mecanismo anticarcinogênico (GAGO-DOMINGUEZ, et.al.; 2005).

O exercício físico, por sua vez, produz grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, e consequentemente aumento da peroxidação lipídica (GAGO-DOMINGUEZ, et.al.; 2006). Esta ocorre através do aumento da oxidação constante nos fosfolípidos de membrana celular e produção de lipoperóxidos como produto inicial, processo este que levará ao início da morte celular, a qual pode ser ocasionada por apoptose ou necrose (VALKO, et.al.; 2004). Ayres et.al. (1998) relataram que marcadores para peroxidação lipídica estão elevados em atletas mulheres amenorréicas, mostrando que a alta intensidade da atividade física é importante fator para aumento de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Em nosso estudo, encontramos aumento da produção de lipoperóxidos em tecido tumoral, nos ratos exercitados, o que corrobora com os dados de Radak et.al. (2002), os quais mostraram aumento da peroxidação lipídica e sua relação com diminuição do tamanho e proliferação de células tumorais (FIGURA 19). A diminuição da peroxidação lipídica pode ser um mecanismo importante responsável pelo aumento do risco de desenvolver câncer (GAGO-DOMINGUEZ, et.al.; 2005). A glutamina, na dosagem utilizada, não mostrou ter nenhum efeito sobre a peroxidação lipídica. Este aminoácido é precursor da síntese de glutathione, enzima antioxidante intracelular, vital na proteção da mitocôndria contra danos oxidativos, e também responsável por melhorar o estado antioxidante da célula (RUTH, et.al.; 2002). Estudo controverso demonstrou que a suplementação com glutamina e sua manutenção plasmática normal, aumentou a concentração citosólica de glutamato na célula tumoral, o qual está relacionado com a inibição do transporte de glutathione mitocondrial para dentro da célula e aumento da susceptibilidade da célula tumoral para o dano oxidativo (CARRETERO, et.al.; 2000). Esta hipótese ainda deve ser testada.

O aumento da produção de radicais livres, produzido durante o exercício, pode afetar várias funções celulares, dentre elas ocasionar apoptose, onde a exposição excessiva a essas substâncias, ocasionam a morte celular por necrose (TEMPLE, et.al.; 2005). A apoptose, morte celular silenciosa, tem sido considerada importante alvo de terapia contra o câncer. Ela é um processo de morte celular que possui papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual (ANAZETTI, 2007).

Diferentemente, a morte celular ocasionada por necrose, ocorre geralmente em resposta a injúria severa, levando a inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular, desencadeando intenso processo inflamatório que pode levar a injúria e assim afetar e lesar células vizinhas (CURTIN, et.al.; 2002) (FIGURA 27). O conhecimento de como as células estão morrendo é importante para se determinar se o tratamento está sendo eficiente no processo de inibição do crescimento tumoral. No presente estudo, quando as células tumorais foram analisadas em citômetria de fluxo, os grupos que sofreram qualquer intervenção (SWG, EW e EWG) apresentaram aumento significativo de células em processo de apoptose quando comparadas ao grupo SW (FIGURA 24) e aos grupos exercitados (EW e EWG) com diminuição significativa de células em processo de necrose quando comparadas aos grupos sedentários (S e SG) (FIGURA 25). Estes resultados podem estar relacionados com o aumento da produção de lipoperóxidos, observada nos ratos exercitados, mostrando que o estresse oxidativo gerado pelo exercício parece participar do mecanismo responsável pelo aumento da apoptose em células malignas. A suplementação com glutamina não provocou efeito diferente daquele já promovido pelo exercício. O mecanismo pelo qual esse aminoácido estaria influenciando a morte celular é desconhecida, porém existem algumas hipóteses como aumento da atividade de linfócitos (FAHR, et.al.; 1994) e/ou aumento de glutamato citosólico com diminuição da capacidade antioxidante da célula tumoral (CARRETERO, et.al.; 2000).

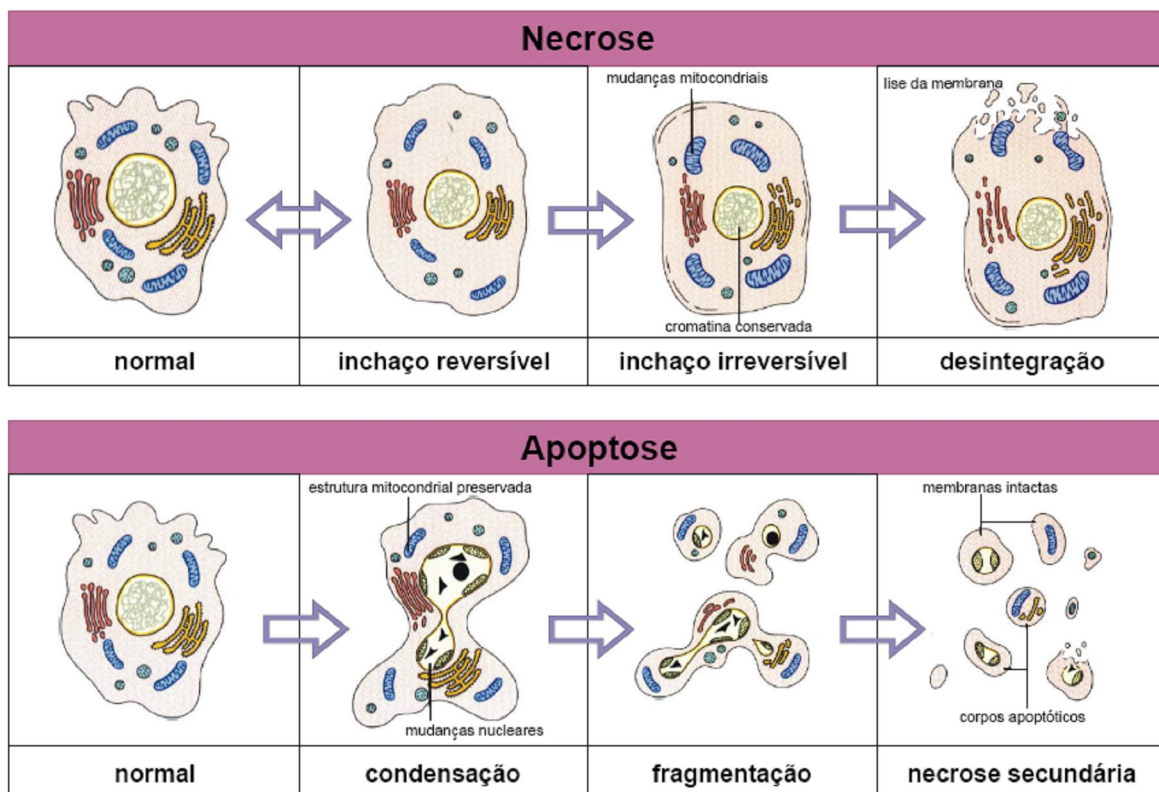


FIGURA 27 – Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose e por necrose.

A apoptose ocorre pela dinâmica sinalização entre diversas proteínas que aceleram ou inibem esse processo, onde o desequilíbrio entre proteínas anti e pró-apoptóticas é importante fator para se desencadear a apoptose (HUERTA, et.al.; 2006; FLEISCHER, et.al.; 2006). A relação entre concentrações de proteínas como Bax e Bcl-2, pró e anti-apoptóticas, respectivamente, serve como fator determinante na sobrevivência ou apoptose das células. O exercício de salto foi capaz de promover alterações significativas na expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Bax, proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2, estimula a apoptose quando se desloca do citosol para membrana mitocondrial, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana e liberação do citocromo c no citosol. Este, por sua vez, se junta com o fator de indução de proteases apoptóticas-1 (APAF-1) formando apoptossomo, o qual estimula a caspase-9 que ativa as caspases efetoras e assim levando a apoptose

celular (LASLIER, et.al.; 2007). Ao contrário da bax, a bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica que inibe proteínas pró-apoptóticas, protegendo a célula do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (HUERTA, et.al.; 2006). Corroborando os achados de Kuczera (2007), neste estudo encontramos aumento significativo da expressão da proteína bax em ratos que foram submetidos ao protocolo de salto (FIGURA 21) com expressiva redução da proteína bcl-2 (FIGURA 22). Baseado nestes resultados podemos afirmar que a realização do exercício de salto favoreceu o balanço pró-apoptótico no ambiente tumoral levando ao aumento da taxa de apoptose com significativa diminuição da taxa de proliferação. Estudo envolvendo indivíduos saudáveis, incluídos num programa de treinamento físico durante 12 meses, investigou a expressão de bax em células do cólon e observou aumento significativo da expressão dessa proteína. Esta é uma característica importante para se estabelecer um ambiente apoptótico e assim evitar a formação de pólipos e câncer (CAMPBELL, et.al.; 2007).

Novamente a glutamina não promoveu efeito diferente daquele já observado ao exercício. Entretanto, recentes estudos sugerem que a glutamina pode contribuir promovendo o crescimento tumoral e suprimindo a apoptose (FUCHS, BODE; 2006). Todorov et.al. (2004) encontraram que dieta rica em glutamina em ratos portadores de tumor reduziu a concentração de glutatona na célula tumoral, aumentando a expressão de bax e caspase 3 e reduzindo a expressão de bcl-2. Segundo Roth et.al. (2002), o uso da glutamina é duvidoso e possui sentidos opostos já que ela pode auxiliar aumentando atividade imunitária, mas aumentar a proliferação de células tumorais e reduzir a apoptose.

Outra proteína mostrada e que esta relacionada à caquexia é PIF. Ela é sintetizada e secretada por tumores que induzem a caquexia (TIDALE, et.al.; 2005). A sua presença está associada a grande perda de peso corporal acompanhada de extensa proteólise e inibição da síntese protéica. Esse aumento da proteólise se dá devido a ativação da proteína quinase (PKC) que é responsável pela ativação da quinase da proteína I κ B (IKK) que leva a degradação de I κ B, proteína que inibe NF- κ B, que conseqüentemente libera as subunidades de NF- κ B, responsável por aumentar a expressão da via proteolítica ubiquitina-proteossoma, aumentando conseqüentemente

a degradação protéica (ELEY, TISDALE; 2007). O exercício de salto foi capaz de diminuir a expressão de PIF. A menor expressão de PIF, provavelmente, é um dos fatores responsáveis por influenciar a menor perda de peso corporal e o exercício físico é importante fator regulador da síntese e degradação protéica (SKIPWORTH, et.al.; 2007). A via pelo qual o exercício é capaz de alterar a expressão dessa proteína é desconhecida. Uma possibilidade é que o tamanho do tumor pode estar influenciando diretamente a sua concentração.

Células do sistema imunitário possuem papel importante no reconhecimento e destruição de células tumorais, onde o aumento de sua atividade ou proliferação pode inibir o crescimento de células malignas (DAS, 2004). O aumento do baço observado naqueles indivíduos portadores de tumor mostra que a presença do tumor funciona como estímulo antigênico para o sistema imunitário. A redução do baço nos indivíduos exercitados comparado aos sedentários pode estar relacionado a diminuição do tamanho do tumor e da severidade da síndrome da caquexia, observada nos indivíduos praticantes de atividade física (FIGURA 16).

O exercício, dependendo da sua intensidade, pode ter efeito potencializador ou inibitório da atividade do sistema imunitário. Quando o exercício é efetuado de forma regular, parece aumentar a resistência à infecções virais, contudo em exercício com intensidade muito elevada, ocorre aumento de infecções no trato respiratório superior (NIEMAN; PEDERSEN, 1999). Há pelo menos duas hipóteses para esses achados: a primeira ocorre devido a mudanças no eixo neuroimunoendócrino (PEDERSEN; TOFT, 2000); e a segunda envolve o metabolismo da glutamina e sua importância na função das células imunitárias (COSTA ROSA, 2004). Este está relacionado com exercício de alta intensidade e longa duração, quando se observa diminuição da concentração plasmáticas de glutamina (SAWAKI, et.al.; 2004), o que pode ocasionar aumento da susceptibilidade a infecções virais por afetar a função imunitária (CASTELL, 2003). A hipótese neuroimunoendócrina está baseada em alterações na concentração de citocinas como, por exemplo, aumento de IL-6 (SCHARHAG, et.al.; 2005) e IL-10 (GOETZ; GUAN, 2007), citocinas com característica anti-inflamatória, e alterações na concentração de vários hormônios como adrenalina, noradrenalina,

hormônio do crescimento e cortisol (PEDERSEN, TOFT; 2000). Em nosso trabalho, a característica do protocolo de exercício aplicado não tinha como objetivo levar os indivíduos a um estado de estresse e sim promover saúde melhorando o estado físico. Assim, atribuímos nossos achados positivos com relação à resposta imunitária, ao aumento da capacidade proliferativa de linfócitos T retirado do linfonodo mesentérico quando estimulados com con-A. A resposta proliferativa de linfócitos durante e após a prática de exercício físico é controversa entre os estudos e há várias possíveis explicações para esse fenômeno como, por exemplo, diferença de intensidade, duração, nível de condicionamento físico e metodologia empregada para análise de leucócitos (PEDERSEN;GOETZ; 2000). Estudos em humanos, indicam que a resposta proliferativa dos linfócitos estimulados com con-A declina durante 2 horas de exercício moderado, porém se eleva por várias horas após a atividade física (NIELSEN; PEDERSEN, 1997). Scharhag et.al. (2005) relataram que em atletas, após 4 horas de exercício moderado, o aumento de IL-6 esteve relacionado com aumento da população de células NK e linfócitos T durante o exercício e significativa diminuição após 2 horas do exercício. Correlacionando com dados encontrados em diversos estudos, conclui-se que durante o exercício moderado e intenso a resposta imunitária se eleva. Contudo, quando muito intenso, é seguido por um período de diminuição dessa capacidade, aumentando o número de infecções. Quando em intensidade moderada, a resposta imunitária permanece elevada por várias horas (PEDERSEN, PEDERSEN; 2002).

Linfócitos utilizam glutamina em grande quantidade como fonte de energia e nitrogênio (CASTELL, 2003). Diminuição em 10% da concentração plasmática de glutamina pode afetar a função das células imunitárias (PARRY-BILLINGS, et.al.; 1990). Glutamina aumenta a proliferação de linfócitos T e diminui a apoptose (FUCHS; BODE; 2006). Linfócitos T cultivados em diferentes concentrações de glutamina mostram que quando a concentração está acima de 1mM ocorre significativo aumento de sua proliferação, diminuição da atividade das caspases pró-apoptóticas 3 e 8 e aumento da expressão de bcl-2 (CHANG, et.al.; 2002). Estudos sugerem que o exercício agudo temporariamente diminui as concentrações plasmáticas de glutamina e suprime a resposta proliferativa dos linfócitos (CASTELL, 2003). A suplementação com

BCAA, precursor de glutamina, a atletas de triatlon foi capaz de manter as concentrações plasmáticas de glutamina, aumentar a proliferação de linfócitos sanguíneos e a produção de algumas citocinas anti-inflamatórias (BASSIT, et.al.; 2002). Estudo controverso com suplementação com glutamina, após 2 horas de exercício a 75% do VO₂max mostrou manutenção da concentração plasmática de glutamina sem alteração na capacidade proliferativa de linfócitos (KRZYWKOWSKI, et.al.; 2001). Nossos dados apontam a glutamina exógena como importante substrato estimulatório para a proliferação dessas células (FIGURA 26). Fahr et.al. (1994) relataram que a suplementação com esse aminoácido aumentou a capacidade proliferativa de linfócitos em ratos portadores de tumor, mostrando que o aumento da toxicidade de células imunitárias estava relacionado com a diminuição do crescimento tumoral. O presente trabalho não encontrou diminuição significativa do crescimento tumoral, apenas uma tendência. Porém a suplementação com glutamina associada ao aumento da capacidade proliferativa de linfócitos foi capaz de melhorar alguns parâmetros de caquexia, tais como aumento do conteúdo de glicogênio muscular, concentração de glutamina plasmática e aumento da apoptose de células tumorais. A taxa de proliferação basal dos linfócitos esteve aumentada nos indivíduos que não portavam tumor e que receberam suplementação com glutamina, mostrando que somente a suplementação foi capaz de estimular essa proliferação.

Vários estudos apontam que em situação de estresse intenso, como por exemplo, doenças malignas, o consumo de glutamina excede a sua síntese resultando na depleção de seus estoques, podendo piorar o estado do paciente (ARDAWI, 1988; PARRY-BILLINGS, 1990). A maioria dos estudos utiliza doses de 15 a 30 gramas por dia e é comum a utilização de dietas enterais e parenterais enriquecidas com glutamina (BOELEN, et.al.; 2001; GRIFFITS, 2001). Molion et.al. (1998) observaram que o uso de 0,3g/Kg/dia de glutamina, através de nutrição parenteral total, em pacientes pós cirurgia foi capaz de melhorar o balanço nitrogenado e aumentar o número de linfócitos. A utilização de 1,5g/Kg/dia de glutamina, via parenteral, em ratos portadores de hepatoma ascítico AH109A aumentou a concentração plasmática e muscular de glutamina, o balanço nitrogenado e evitou a perda de peso excessiva sem proporcionar

estímulo para o crescimento tumoral (KIABARA, et.al.; 1994). A dose utilizada no presente estudo (0,125g/Kg/dia) é inferior às utilizadas na maioria dos estudos, contudo essa dose foi capaz de aumentar o estímulo de linfócitos sem interferir na proliferação de célula tumoral. Uma dose maior poderia causar ou não alterações mais visíveis nos parâmetros de caquexia e/ou alterações relacionadas ao tumor.

Em resumo, nosso estudo sugere que a suplementação com glutamina e o protocolo de treinamento de saltos utilizado, foram eficazes em alguns parâmetros avaliados. A associação entre exercício físico e dieta teve efeito adicional apenas na taxa proliferativa de linfócitos, mostrando que em ratos suplementados e exercitados portadores de tumor (EWG) o aumento da capacidade foi significativamente maior comparado a todos os grupos. Nós aventamos a hipótese que o mecanismo responsável pela melhora no parâmetro imunitário avaliado promovido pelo exercício e a glutamina seja efetuado por vias diferentes; o exercício promovendo alterações no ambiente hormonal e de síntese protéica e a suplementação como um importante substrato energético e protéico para proliferação de linfócitos. Com relação aos outros parâmetros avaliados, observamos que o exercício possui importante papel na melhora do indivíduo portador de tumor, diminuindo o crescimento tumoral e melhorando os parâmetros relacionados com a síndrome da caquexia. Apesar de várias evidências de que o exercício tem papel importante como coadjuvante na prevenção e tratamento do câncer, a vasta gama de tumores existentes e os diversos protocolos de exercícios encontrados justificam a necessidade de se realizar mais estudos na área.

Em geral, estudos com atividade física e câncer possuem inadequado controle da intensidade e volume, dificultando a obtenção de dados sobre qual o tipo de exercício é ideal para pacientes com câncer (QUIST, 2006). A prescrição de exercício para esse tipo de pacientes deve ser personalizada, pois muitos fatores podem influenciar na sua tolerância. A maioria das intervenções utilizadas em paciente com câncer seguem as recomendações do Colégio Americano de Medicina Esportiva (2006) que sugere que a prescrição do exercício em pessoas saudáveis deve levar em consideração componentes como frequência, intensidade, tipo, tempo e progressão do exercício, sendo as recomendações de sessões diárias de 30 a 60 minutos de

exercício físico moderado a intenso, 3 a 5 vezes por semana. Para pacientes com câncer, Courneya et.al. (2000) recomendam 20 a 30 minutos de exercício contínuo em intensidade moderada de 3 a 5 vezes por semana, observando o estado e adaptação do paciente após cada sessão de treinamento. Segundo Lucía et.al. (2003) deve-se realizar exercícios que envolvam grandes grupos musculares juntamente com exercício de força para melhorar a síntese protéica. Um típico programa de treinamento inclui 3 a 5 sessões por semana e a duração deve ser aumentada até que o exercício se torne contínuo por 30 minutos. A intensidade varia de 60 a 85% da frequência cardíaca máxima, ou seja um exercício considerado moderado (LUCÍA et.al.; 2003).

7 CONCLUSÃO

O treinamento de salto em meio aquático foi eficaz em diminuir o tamanho do tumor, retardar a taxa de crescimento tumoral e aumentar a apoptose, resultado este relacionado com aumento da produção de lipoperóxidos, aumento da expressão de bax e diminuição da expressão de Bcl-2. Ainda, foi capaz de atenuar alguns parâmetros relacionados à síndrome da caquexia como diminuição da expressão de PIF, aumento do conteúdo de glicogênio hepático, diminuição da concentração de lactato nos indivíduos portadores de tumor de Walker 256. Com relação ao sistema imunitário, a prática do exercício de salto foi capaz em aumentar a proliferação de linfócitos T quando estimulados com con-A. A suplementação com glutamina, na dose de 125 mg/Kg/dia durante o período onde o tumor já encontrava-se instalado, não foi capaz de atuar inibindo o crescimento tumoral, contudo mostrou eficaz aumentando a proliferação de linfócitos T quando estimulados com con-A.

Os resultados demonstram que a prática de exercício físico pode servir de auxílio no tratamento de indivíduos portadores de tumor; pois é capaz de contribuir positivamente em mecanismos chave da sinalização envolvida no crescimento e proliferação de células tumorais, potencializar a atividade do sistema imunitário e melhorar o quadro geral do paciente por atenuar alguns parâmetros relacionados as síndrome da caquexia.

8 REFERÊNCIAS

ADAMI,H.O.; DAY,N.E.; TRICHOPOULOS,D.; et.al. Primary and secondary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. **European Journal of Cancer**. 37: 118-127, 2001.

ADAMS,J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. **Nature Reviews Cancer**. 4,349-360, 2004.

AGHILI,M.; FARHAN,F.; RADE,M. A pilot study of the effects of programmed aerobic exercise on the severity of fatigue in cancer patients during external radiotherapy. **European Journal of Oncology Nursing**. 11:179-182, 2007.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS,J.; et.al. **Biologia molecular da célula**, 4ed., Artmed, Porto Alegre, 1997.

ALPERS,D.H. Glutamine: Do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? **American Gastroenterological Association**. 130:106-116, 2006.

ARDIES, C.M. Exercise, cachexia and cancer therapy a molecular rationale. **Nutritional Cancer** 42(2): 143-57, 2002

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C. et.al. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**. 21 977-985, 2005

ARGILES J.M.; MEIJSSING,S.H.; PALLARES-TRUJILLO, J.; et al. Cancer cachexia: A therapeutic approach. **Medical Research**. 21:83-101, 2001.

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medical Research**. 17(5):477-98, 1997.

AYRES S, BAER J, SUBBIAH MT. Exercised-induced increase in lipid peroxidation parameters in amenorrheic female athletes. **Fertil Steril**. 69:73 – 7, 1998.

BAAR, K.; ESSER, K.; Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology**. 276(1 Pt 1):C120-C127, 1999.

BACURAU, R. F. P.; BELMONTE, M. A.; SEELAENDER, M. C. L.; et.al. Effect of a Moderate Intensity Exercise Training Protocol on the Metabolism of Macrophages and Lymphocytes of Tumour-bearing Rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 18, p. 249-258, 2007.

BAGCI,E.Z.; VODOVOTZ,Y.; BILLIAR,T.R. et.al. Bistability in Apoptosis: Role of Bax, Bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. **Biophysical Journal**, 80: 1546-1559, 2006.

BARACOS, V.E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in câncer associated caquexia. **Nutrition**.16:1015-1018, 2000.

BARACOS, V.E. Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia. **Cancer**. 92:1669-1677, 2001.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C.H. Cancer cachexia. **Surgical Oncology**. 8:133-141, 1999.

BASSIT, R.A.; SAWADA, L.A.; BACURAU, R.F.P.; et.al. Branched-chain amino acid supplementation and the immune response of long-distance athletes. **Nutrition**. 18:376-379; 2002.

BING,C.; BROWN,M.; KING, P.; et.al. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP1) and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. **Cancer Research**. 60:2405-2410, 2000.

BIOLO,G.; DE CICCIO,M.; DAL MAS,V.; et.al. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain-enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. **Nutrition**, 22:1-8, 2006

BIOLO,G.; ZORAT,F.; ANTONIANI,R.; et.al. Muscle glutamine depletion in the intensive care unit. **The International Journal of Biochemistry & Cell biology**. 37:2169-2179, 2005.

BOELEN,S.P.G.; NIJVELDT,R.J.; HOUDIJK, A.P.J.; et.al. Glutamine alimentation in catabolic state. **Journal of Nutrition**. 131: 2569-2577, 2001.

BONGAERTS,G.P.A.; HALTEREN,H.K.; VERHAGEN,C.A.M.; et.al. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolic. **Medical Hypotheses**, 2006.

BORSHEIM E, BAHR R. Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. **Sports Medicine**. 33(14):1037-60, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**. 72:248-254, 1976.

BURNHAM, T.R., WILCOX,A. Effects of exercise on physiological and psychological variables in cancer survivors. **Medicine and Science in Sports & Exercise**. 34, 1863-1867, 2002.

BUSQUETS,S.; DEANS,C.; FIGUERAS,M.; et.al. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachetic gastro-intestinal cancer patients. **Clinical Nutrition.**, 1-5, 2007.

CALDER, P.C. Glutamine and the immune systems. **Clinical Nutrition.** 13:2, 1994.

CAMPBELL,K.; MCTIERNAN,A. Exercise and biomarkers for cancer prevention studies. **Journal of Nutrition.** 137:161-169, 2007.

CAMPBELL, P.T.; SLOAN,M.; KREIGER,N. Physical activity and stomach cancer risk: The influence of intensity and timing during the lifetime 43(3):593-600, 2007.

CARRETERO, J.; OBRADOR, E.; PELLICER, J.A.; et.al. Mitochondrial glutathione depletion by glutamine in growing tumor cells. **Free Radical Biology and Medicine.** 29:913-923; 2000.

CASTELL,L.M. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. **Sports Medicine**, 33:323-45,2003.

CASTELL, L.M.; NEWSHOLME, E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition**, vol.13, 7/8, 1997.

CHANG,W.K.; YANG,K.D.; CHUANG,H.; et.al. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulation glutathione and Bcl-2 levels. **Clinical Immunology**, vol 104(2): 151-160,2002.

COLÉGIO AMERICANO DE MEDICINA ESPORTIVA. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Ed.7 Philadelphia,PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

COLLINS, C.L.; WASA, M.; SOUBA, W.W.; et al. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. **Journal Cell Physiology** 176:166-78, 1998

COSTA ROSA,L.F. Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. **Evidence Bases Complement Alternative Medicine**. 1: 63-70,2004.

COSTELLE,P. BOSSOLA,M. MUSCARITOLI,M. et.al. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin and Ca²⁺ dependent proteolytic systems in the muscle of tumor bearing rats. **Cytokine**. 19:1-5, 2002.

COTRAN, RS; KUMAR, V; COLLINS,T. **Patologia Estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p233-295, 2000.

COURNEYA, K.S; KARVINEN,K.H.; CAMPBELL, K.L.; et al. Associations among exercise, body weight, and quality of life in a population-based sample of endometrial cancer survivors. **Gynecologic Oncology**. 97, 422-430, 2005.

COURNEYA, K. S.; VALLANCE, J.K.; MCNEELY,M.L. et al. Exercise issues in older survivors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 51-249-261, 2004.

COURNEYA, K.S. Exercise in cancer survivors: an overview of research. **Medicine Science and Sports Exercise**. 35(11):1846-52, 2003.

COURNEYA,K.S.; MACKEY,J.R.; JONES,L.W. Coping with cancer: can exercise help? **The Physician and Sports Medicine**, 28:49-73, 2000.

COURNEYA, K.S.; FRIEDENREICH, C.M. Determinants of exercise during colorectal cancer treatment an application of theory of planned behavior. **Oncology Nurse Forum** 24(10):1715-23, 1997.

CURI, R. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunology Methods.**, 265: 49-72, 2002.

DAS, U.N. Perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids, immune systems functions. **Immunology and Cell Biology.** 78:31-39, 2004.

DI PASQUALE, M.G. Amino acids and proteins for the athlete – the anabolic edge. **Nutrition in exercise and sport.** New York: CRC press, 1997.

DOMINGUES, M.G.; JIANG, X.; CASTELAO, E. Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer. **Medical hypotheses**, 2006.

DOYLE, C.; KUSHI, L.H.; BYERS, T. et.al. Nutrition and physical activity during and after cancer treatment: an American cancer society guide for informed choices. **CA Cancer Journal Clinical.** 56: 323-53, 2006.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain Symptom Manage.** 20:214-232, 2000.

ELEY, H.; TISDALE, M.J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **The Journal of Biological Chemistry.** 282(10): 7087-7097, 2007.

EMERY, P.W. Cachexia in experimental models. **Nutrition.** 15:600-603, 1999.

ENGLE; JONES, J.B. Causes and elimination of essential blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers, improved conditions of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Annals of Biochemistry**. 88:475-484, 1978.

ESCARCEGA, R.O.; FURNITES-ALEXANDROS, S.; GARCIA-CARRASCO, M. et al. The transcription factor nuclear factor Kappa B and cancer. **Clinical Oncology**. 19: 154-161, 2007.

FAHR, M.; KORNBLUTH, J.; BLOSSOM, S.; et al. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth. **J. Parenteral enteral Nutrition** 18:471-77, 1994.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.K.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and inhibition of tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy Control**. 1:259-268, 1991.

FLEISCHER, A.; GHADIRI, A.; DESSAUGE, F. et al. Modulation apoptosis as a target for effective therapy. **Molecular Immunology**. 43:1065-1079, 2006.

FRIEDENREICH, C., AND ORENSTEIN, M. "Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms." **Journal of Nutrition** 132: 3456S-3464S, 2002.

FUCHS, B.C.; BODE, B.P. Stressing out over survival: Glutamine as an Apoptotic modulator. **Journal Surgery Research**. 131:26-40, 2006.

FÜRST, P.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P. Why should a single nutrient – glutamine – improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. **Clinical Nutrition Supplements**. 1, 3-15, 2004.

GAGO-DOMINGUEZ,M.; JIANG,X.; CASTELAO,E. Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer. **Medical Hypotheses**, 2006.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J.E.; PIKE M.C.; et. al. Role of Lipid Peroxidation in the Epidemiology and Prevention of Breast Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive** 14(12): 2928-2939, 2005.

GOETZ,L.H.; GUAN,P.A.S. Repeated exercise en mice alters expression of IL-10 and TNF in intestinal lymphocytes. **Brain, Behavior and immunity**, 2007.

GORDON, J.N.; GREEN,S.R.; GOGGIN,P.M. Cancer cachexia. **QJ Medicine**. 98:779-788, 2005.

GRIFFITHS,R.D. The evidence for glutamine use in the critically-ill. **Proceedings of the Nutrition Society**. 60:403-410,2001.

GROSS,A.; McDONNELL,J.M.; KORSMEYER,S.J. BCL-2 family members and the mitochondria inapoptosis. **Genes Dev**. 13:1899, 1999.

HIRAI, K.; HUSSEY, H.J.; BARBER, M.D.; et.al. Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. **Cancer Research**. 58:2359-2365, 1997.

HISCOC,N.E.W.; PETERSEN E.W.; KRYWKOWSKI, K.; et.al. Glutamine supplementation further enhances exercise-induced plasma IL-6. **Apply of Physiology** 95:145-148, 2003.

HUERTA,S.; GOULET,E.J.; LIVINGSTON,E.H.; et.al. Colon cancer and apoptosis. **The American Journal of Surgery**. 191:517-526, 2006.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA Cancer Journal Clinical**. Mar-Apr; 52(2):72-91, 2002.

JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; BROADBENT, P.; et al. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal Physiology**.255(2 pt 1): E166-E172, 1988.

JING-XIANG, S.; XIAO-HUANG, T.; LIE,W. et al. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition in patients with colorectal cancer. **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, 49-53, 2004.

JOYNER,M. Glutamine and arginina: Immunonutrients and metablic modulators? **Exercise and Sports Science Reviews**. News Briefs, 2005

LABOREY,J.L. Physical activity in the management of cancer-related fatigue induced by oncological treatment. **Annales de readaptation et de medicine physique**. 50:450-454, 2007.

LAEMMLI,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259):680-685, 1960.

LAGRANHA,C.J.; SENNA,S.M.; LIMA,T.M. et.al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 3602:210-217,2004.

LASLIER,L.; CARTRON, P.F.; JUIN,P.; et.al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. **Apoptosis**. 12: 887-896, 2007.

LEE, IM. Physical Activity and Câncer Prevention – Data from Epidemiologic Studies. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 2003

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the Ubiquitin-Proteosome pathway in normal and disease states. **Journal Nutrition**. 129:227-237, 1999.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, 335:632-635, 1989.

LEUNG,P.S.; ARONSON,W.J.; NGO,T.H.; et.al. Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro. **Journal Apply Physiology**. 96:450-454, 2003.

LISSA,M.D. Efeitos da suplementação com L-glutamina sobre a resposta imunitária de linfócitos e macrófagos, obtidos de ratos submetidos ao treinamento de natação. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR, 2004.

LORITE,M.J.; SMITH,H.J.; ARNOLD,J.A. et.al. Activation of ATO-ubiquitin-dependet proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). **British Journal of Cancer**. 85:297-302, 2001.

LU, F. Reactive oxygen species in cancer, too much or too little. **Medical Hypotheses**, 2007

LÚCIA,A.; EARNEST,C.; PÉREZ,M. Câncer-related fatigue:can exercise physiology assist oncologist? **The Lancet Oncology**. 4:616-625, 2003.

KAIBARA,A.; YOSHIDA,S.; YAMASAKI, K.; et.al. Effect of glutamine and chemotherapy on protein metabolism in tumor bearing rats. **Journal Surgery Research**. 57: 143-149, 1994.

KHAL,J.; HINE,A.V.; FEARON,K.C.H. et.al. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 37:2196-2206, 2005.

KLIMBERG,V.S.; SOUBA, W.W.; SALLOUM, R.M.; et al. Glutamine enriched diet support muscle glutamine metabolism without stimulating tumor growth. **Journal Surgery Research**. 48:319-323, 1990.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI,K.; et.al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced change in lymphocytes function. **American Journal of Physiology Cell**. 281:1259-1265, 2001.

KUCZERA,D. Suplementação crônica da dieta com β -Hidroxi β -metilbutirato (HMB) e treinamento contra-resistido reduzem a taxa de crescimento do tumor de Walker 256 – Identificação dos mediadores participantes neste processo. 2007. **Dissertação de Mestrado**. UFPR, Curitiba/PR.

MacDONALD,N.; EASSON,A.M.; MAZURAK, V.C.; et.al. Understanding and managing cancer cachexia. **Journal of American College of Surgeon**. 3:143-161, 2003.

MAY, P.E.; BARBER, A.; PLIMPIO, J.T.D.; et.al. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginina, and glutamine. **The American Journal of Surgery**. 183:471-479, 2002.

MEDINA, M.A; SÁNCHEZ-JIMÉNES, F.; MARQUEZ, J.; QUESADA, A.R.; CASTRO, I.N. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. **Molecular Cell Biochemistry** 113: 1-15. 1992

MINUZZI, L.G. Estudo da associação do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e imunidade em ratos com tumor de Walker 256. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR.

MOLION,B.J.; STEHLE,P.; WACHTLER, P.; et.al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. **Ann. Surgery**. 227: 302-308, 1998.

MURPHY,E.A.; DAVIS,J.M.; BROWN,A.S.; et.al. Effects of moderate exercise and oat β -glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. **Journal of Applied Physiology**. 97:955-959, 2004.

NEUZIL, J.; WANG,X.F.; DONG,L.F. et.al. Molecular mechanism of mitocan-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. **FEBS letters**. 580:5125-5129, 2006.

NEWSHOLME,P.; LIMA,M.M.R.; PROCÓPIO,J.; et.al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36:153-163, 2003

NEWSHOLME,P.; CURI,R.; CURI,T.C.P.; et.al. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **Journal Nutrition Biochemistry**, 10:316-324, 1999.

NEWSHOLME, E.A.; CALDER,P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**, vol.13,7/8, 1997.

NGO, T.H.; BARNARD, R.J.; LEUNG, P.S.; et.al. Insulin like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 modulate prostate cancer cell growth and apoptosis: possible mediators for the effects of diet and exercise on cancer cell survival. **Endocrinology** 144: 2319–2324, 2003.

NIELSEN,H.B.; PEDERSEN, B.K. Lymphocytes proliferation in response to exercise. **European Journal Apply Physiology**. 75: 375-379, 1997.

NIEMAN,D.C.; PEDERSEN,B.K. Exercise and immune function. Recent development. **Sports and Exercise**. 27(2):73-80,1999.

NIEMAN, D.C.; COOK, V.D.; HENSON, D.A.; et.al. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. **International Journal of Sports and Medicine**. 16:334-337, 1994.

NUNES,E.A. Efeito do treinamento de saltos e da suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR.

OLDERVOLL,L.M.; KAASA,S.; HJERMSTAD,J.A. et.al. Physical exercise results in the improved subjective well-being of a few or is effective rehabilitation for all cancer patients? **European Journal of Cancer**. 40: 951-962, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em: fevereiro de 2007.

PARRY-BILLINGS, M.; EVANS, J.; CALDER, P.C.; et al. Does glutamate contribute to immunosuppression? **Lancet**, 336:523, 1990.

PASTERNAK J. J. **Genética Molecular Humana**. Mecanismos de Doenças hereditárias Manole 1.ed. p.365-412, 2002.

PATE, R.R.; PRATT, M.; BLAIR, S.N.; et al. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **Journal American Medicine Association**. 273: 402-7, 1995.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune systems: regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews** 80, 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med.** 34:246-251, 2005

PESSINI, C. Efeito da associação de exercício físico e suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) sobre crescimento tumoral e caquexia em ratos portadores de tumor. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Curitiba/PR, 2007.

PEDERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Apply Physiology.** 98:1154-2262, 2005.

RADAK, Z.; GAAL, D.; TAYLOR, A.W.; et.al. Attenuation of the development of murine solid leukemia tumor by physical exercise. **Antioxidant Redox Signal.** 4:213-219, 2002.

ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos. **Atividade Física & Saúde** (6) 2:39-46, 2001.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; et. al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentration in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition.** 22:564-571, 2006.

ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N. et.al. Regulative Potential of Glutamine – Relation to glutathiones **Metabolism Nutrition**; 18:217-221, 2002.

SANTOS,R.V.T.; CAPERUTO,E.C.; COSTA ROSA,L.F.B.P. Effects os acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Siences**. 80: 573-578, 2007.

SAWAKI,K.; TAKAOKA, I.; SAKURABA, K.; et.al. Effects os distance running running and subsequent intake of glutamine rich peptide on biomedical parameters of male japonese athletes. **Nutrition Research**. 24:59-71; 2004.

SCHARHAG,J.; MEYER,T.; GABRIEL,H.H.W.; et.al. Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function? **British Journal of Sports Medicine**. 39:171-177, 2005.

SEGAL,R.J., REID,R.D., COURNEYA,K.S., et al. Resistance exercise in men receiving androgen depriveition therapy for prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 21, 1650-1659, 2003.

SILVA,E.C.; GARCIA,J.; RODRIGUES,J.; et.al. Exercício físico e metabolismo dos carboidratos e lipídios nas dislipidemias e hiperglicemia. **Ver.Inst.Cienc.Saúde**. 22(2): 95-103, 2004.

SKIPWORTH, R.J.E.; STEWART,G.D.; DEJONG, C.H.C.; et.al. Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumor interaction? **Clinical Nutrition**. 26:667-676; 2007.

STEVINSON,C.; FAUGHT,W.; TEED,H.; et.al. Association beteen physical activity and quality of life in ovarian cancer survivors. **Gynecologic oncologist**. 106:244-250, 2007.

TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G.; DAWES,I.W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends in Cell Biology**. 15(6): 319-326, 2005.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology** 20:340-348, 2005.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbecks Arch Surg**, 389:299-305, 2004.

TISDALE, M.J. Cachexia in cancer patients. **Nature** 2:862-871, 2002.

TISDALE, M. J. Metabolic Abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, v. 16, p. 1013-1014, 2000.

TODOROVA, V.K.HARMS,S.A., KAUFMANN,Y.; et.al. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. **Breast Cancer Research Treatl.** 88:247; 2004.

TODOROV, P.; CARIUK,P.; MACDEVITT,T. et.al. Characterization of a cancer cachetic factor. **Nature**, 379:739-42, 1996

TOWBIN, H.; STAEHELIN,T.; GORDON,J. Eletrophoretic transfer os proteins from polyacrylamides gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceediong of National Academy of Science of the USA.** 76(9):4350-4354, 1979.

VIEIRA,R.; NASCIMENTO,R.; ARIZAWA,S.; CURI,R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. **Arq,Biol.Tecnol.** 33:819-829, 1990.

ZAMBON,A.C.; MCDEARMON, E.L.; SALOMONIS, N.; et.al. Time and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. **Genome Biology.** 4(10):R61, 2003.

ZHOU,J.; ZHANG,S.; ONG,C.N; et.al. Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**. 72: 132-144. 2006.

WATSON,A.J.; MERRITT,A.J.; JONES,L.S.; et.al. Evidence of reciprocity of Bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. **British Journal of Cancer**. 73:889-895, 1996.

WESTERLIND, K. C. Physical activity and cancer prevention – mechanisms. **Medicine and Science In Sports And Exercise**, V. 35, N. 11, P. 1834-1840, 2003.

YOUNG-McCAUGHAN, S.; SEXTON, D.L. A retrospective investigation of the relationship between aerobic exercise and quality of life in women with breast cancer. **Oncology Nurse Forum**. 18:751-757, 1991.

YOSHIDA, S.; KAIBARA, A.; ISHIBASHI, N.; et al. Glutamine supplementation in cancer patients. **Nutrition**.17:766-8, 2001.

YU,H.; ROHAN,T. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. **Journal Natl Cancer Institute**. 92: 1472-89, 2000.

